

①

未成熟内耳の蝸牛における薬物移行および
分裂と分化に関する実験的研究

大学院医学研究科外科系専攻（耳鼻咽喉科学）

坂本 平守

主科目担当

および 中井義明教授

研究指導

(要 約)

内 耳 の 発 達 過 程 に 関 す る 報 告 は 多 々 み ら れ
る が 、 内 耳 の 分 裂 、 分 化 の 観 点 か ら 未 成 熟 内
耳 の 機 能 完 遂 を 詳 細 に 検 討 す る こ と は 、 内 耳
の 病 態 研 究 の み な ら ず 、 鳥 類 以 前 の 動 物 内 耳
に 報 告 さ れ て い る 内 耳 感 覚 細 胞 の 再 生 機 転 を
検 討 す る 上 で も 重 要 な 課 題 で あ る が 、 こ の 面
か ら の 検 討 は ほ と ん ど み ら れ な い 。 一 方 、
耳 毒 性 薬 剤 に よ る 内 耳 障 害 は よ く 知 ら れ た と
こ ろ で あ る が 、 未 成 熟 内 耳 へ の 影 響 、 特 に 薬
物 移 行 の 詳 細 に つ い て は 不 明 で あ る 。 本 研
究 で は こ れ ら 、 未 成 熟 内 耳 の 分 裂 と 分 化 、 お
よ び 未 成 熟 内 耳 へ の 薬 物 移 行 の 解 析 か ら 、 未
成 熟 内 耳 の 属 性 の 検 討 を 目 的 と し た 。

1) モ ル モ ッ ト 妊 娠 前 期 (胎 生 3 3 日 ~ 3 9
日) 、 妊 娠 中 期 (胎 生 4 4 ~ 4 6 日) 、 妊 娠
後 期 (胎 生 5 5 日 以 降) の 全 時 期 を 通 じ て カ
ナ マ イ シ ン (K M) の 膜 迷 路 へ の 移 行 が 認 め
ら れ た 。 妊 娠 前 期 に お い て 血 管 条 に K M が
認 め ら れ な か っ た が そ の 原 因 と し て 、 毛 細 血

管が未完成であると考えられた。

2) モルモット妊娠中期において K M が基板に多量認められ、妊娠後期では同部に K M の存在を認めなかったことより、妊娠中期においては基板形成が未完成であると示唆された。

3) K M が、コルチ器に達する経路としては2つのルートがあることが判明した。1つはラセン縁・蓋膜系経由であり、もう一方は、ラセン血管系経由であった。

4) モルモット妊娠前期では、蝸牛管の膜迷路において bromodeoxyuridine (BrdU) の標識は認められず、周囲の迷路骨胞結合組織の細胞核内に BrdU の存在を認めた。すなわち、この時期では、すでにコルチ器及び血管条相当部位の分裂は終了し、迷路骨胞においては分裂増殖時期であると考えられた。

5) マウスの内耳感覚細胞は、胎生13日前後に S 期が存在し、その後は分化に移行すると考えられた。

6) $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ は、モルモット妊娠前期、妊娠中期においては存在せず、妊娠後期になって初めて血管条辺縁細胞の基底陥入に認められた。マウスにおいては、生後14日目に同酵素が出現した。このことは、その時期以前に分化に移行した血管条にこの時期になり初めて、蝸牛内静止電位 (EP) 産生という主たる機能遂行のための基礎が出来上がったことを意味しており、電気生理学的報告と一致した。

(緒 言)

内耳の発生、発達過程についての研究は、Bast and Anson¹⁾の光学顕微鏡により詳細な報告がなされ、その後 Altmann²⁾によりヒト聴器の正常発生過程について報告されている。さらに電子顕微鏡の発達に伴い Bredberg³⁾、Kikuchi⁴⁾、Igarashi^{5・6・7)}、Anniko^{8・9・10・11)}、Nakai^{12・13)}らによって、より詳細な形態学的研究がなされている。さらに、Van De Water^{14・15)}の *in vivo* および *in vitro* のシステムを用いた実験的研究も見られるようになり、Sher¹⁶⁾はマウス内耳の発生過程を光学顕微鏡下にて経時的に観察し、発生分化には内耳神経による神経支配の重要性を報告している。しかし、内耳の分裂、分化及び成熟についての研究は、ほとんどが胚発育の後期または生後成熟に関するものであり、超微細構造レベルでの蝸牛発育に関する継続的な内耳の形態をふまえての機能的完遂に言及した報告は非常に少ない。そのた

め、未成熟内耳の特殊性や成熟内耳に認められるような事象をそのまま未成熟内耳に適応するには問題がある。例えば、未成熟内耳は成熟内耳と比較して、その脆弱性が強いという報告や、内耳そのものの内耳血液関門の未完成との問題や、その反面、胎児胎盤バリアーにより胎児が保護されている事などは周知の事実である。それらのことより我々は形態学的所見をふまえた上で、内耳血液関門の検討ならびに未成熟内耳の機能完遂がいつどのように起こるのかを検討すると共に成熟、未成熟内耳の属性の差を観察する事を目的とした。

(実 験 材 料 及 び 方 法)

1) 材 料

実 験 動 物 に は 、 胎 生 3 3 日 より 胎 生 5 5 日
以 降 の ハ ー ト レ イ 系 モ ル モ ッ ト (表 1) と 胎 生
1 4 日 より 生 後 2 1 日 ま で の d d y 系 マ ウ ス
(表 2) を 使 用 し た 。 即 ち 、 モ ル モ ッ ト で は
胎 生 3 3 ~ 3 9 日 、 胎 生 4 4 ~ 4 6 日 お よ び
胎 生 5 5 日 以 降 の 3 群 に 分 類 し 、 そ れ ぞ れ 妊
娠 前 期 、 中 期 、 後 期 と 仮 称 し た 。 マ ウ ス に
お い て は 、 胎 生 1 4 日 、 胎 生 1 8 日 、 生 後 1
日 、 生 後 7 日 、 生 後 1 4 日 、 生 後 2 1 日 を 用
い た 。 な お 、 胎 齢 は 膣 栓 形 成 お よ び 頭 殿 長
(C R L) を も っ て 決 定 し 、 生 後 日 齢 は 出 生 確 認
日 を 0 日 と し て 計 算 し た 。 今 回 、 胎 生 期 に
お け る マ ウ ス の 内 耳 を 観 察 す る た め に 胎 仔 を
採 取 し た と こ ろ 、 胎 生 1 1 日 で は 頭 殿 長 7 m m
、 胎 生 1 4 日 に お い て は 頭 殿 長 1 4 m m で あ っ
た が 、 胎 生 1 1 日 に お け る 内 耳 蝸 牛 の 解 剖 学
的 部 位 に 関 し て の 識 別 が 困 難 で あ っ た た め 、
胎 生 1 4 日 以 降 の マ ウ ス 内 耳 を 観 察 し た 。

2) 方 法

(1) 未成熟内耳の光学顕微鏡および透過電子顕微鏡による観察

Sodium Pentobarbital (20-25mg/kg) 腹腔内投与後断頭、側頭骨を採出し、光学顕微鏡標本作製のために4%パラホルムアルデヒドによる固定後、定法によりパラフィン切片を作製した。電子顕微鏡標本には、4℃の2.5%グルタルアルデヒド(0.1M磷酸緩衝液PH7.4)にて2時間の前固定を行い、同緩衝液で4℃にて洗浄後、4℃の2.0%のオスミウム酸(0.1M磷酸緩衝液PH7.4)にて2時間の後固定を行った。固定終了後、上昇アルコール系にて脱水、EPON樹脂包埋を行った。Porterblum MT II B ウルトラミクロームで超薄切片を作製、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を施した後、日立H-300型透過型電子顕微鏡により観察した。

(2) モルモット胎生蝸牛における薬物移行
モルモット母獣に Sodium Pentobarbital
(20 - 25 mg / kg) 腹腔内投与後、カナマイシン
(K M) (200 mg / kg) を頸静脈より投与し、30分
後に開腹して胎仔を取り出し側頭骨を採取し
た。採取した側頭骨は、4%パラホルムアル
デヒドにて固定を行い、0.1M EDTA液で脱灰
操作を行った。その後10 μ mの凍結切片を作
製した。1次抗体として抗KM抗体(ウサギ)
(Scantibodies Laboratories 社) を用いて
37℃、30分間インキュベートし2次抗体とし
てFITC-抗ウサギ抗体(ヤギ)(Scantibodies
Laboratories 社) を1:40または1:100に希釈
して使用した。negative controlとしては、
過度のKMを吸収させた1次抗体あるいは1
次抗体の代わりにウサギ正常血清を用いた。
一方、positive controlとしては母獣の腎臓
を用いて同一染色を行った。

(3) 内 耳 膜 迷 路 の 分 裂 と 分 化

I] Bromodeoxyuridine (BrdU) 標 識 法 に よ る

内 耳 の 分 裂 の 検 討

分 裂 の 指 標 と し て thymidine の analog で あ
る Bromodeoxyuridine (BrdU) を 用 い た 。 す な
わ ち 、 Cell proliferation kit (Amersham 社)
(0.01-0.02ml/g) の BrdU を モ ル モ ッ ト 、 マ ウ
ス の 母 獣 に 腹 腔 内 投 与 し 、 投 与 終 了 1 時 間 後
に 開 腹 し て 胎 仔 を 摘 出 し 側 頭 骨 を 採 取 し た 。
各 側 頭 骨 は 、 4% パ ラ ホ ル ム ア ル デ ヒ ド 、 70%
エ タ ノ ー ル 、 ホ ル マ リ ン 固 定 を そ れ ぞ れ 行 い
、 パ ラ フ ィ ン 切 片 (10 μ m) な ら び に 凍 結 切 片
(10 μ m) を 作 製 し 以 下 の 反 応 を 行 い 観 察 し た 。

(A) Diamino benzidine 法 (DAB 法)

内 因 性 ペ ル オ キ シ ダ ー ゼ を 0.3% 過 酸 化 水 素 加
メ タ ノ ー ル で 30 分 間 処 置 に て 除 去 後 、 1 次 抗
体 と し て 抗 BrdU 抗 体 (Amersham 社) を 用 い 、
ABC kit (Vectastain 社) に お い て
Diamino benzidine (DAB) 反 応 を 行 い 、 BrdU の
存 在 部 位 の 検 討 を 行 っ た 。

〈B〉 Alkalinephosphatase - Anti -

Alkalinephosphatase 法 (APAAP 法)

DACCO 社 の APAAP kit を用いた。1 次抗体には、抗 BrdU 抗体 (マウス) (Amersham 社) を使用し、2 次抗体として抗 - マウス抗体 (ウサギ) を用い、その後 APAAP 複合体を結合させ呈色反応 (表 3) を行った。

〈C〉 蛍光抗体法

蛍光抗体法としては、1 次抗体に抗 BrdU 抗体 (マウス) (Becton Dickinson 社) を用い、2 次抗体として FITC - 抗マウス抗体 (ウサギ) (Miles 社) を用いて蛍光顕微鏡にて観察を行った。

Ⅱ) $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ による内耳分化の検討

分化の指標として $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ を用いた。
 $\text{Sodium Pentobarbital}$ ($20 - 25 \text{ mg/kg}$) 腹腔内
投与後、断頭にて側頭骨を摘出し内耳の凍結
切片 ($10 \mu\text{m}$) を作製した。

〈A〉 Diamino benzidine 法 (DAB 法)

1 次抗体として、抗 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 抗体
(ヤギ) (Chemicon 社) を使い、ABC kit
(Vectastain 社) にて染色操作を行った。

〈B〉 蛍光抗体法

蛍光抗体法においては、1 次抗体として
抗 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 抗体 (ヤギ) (Chemicon 社)
を使い、2 次抗体として FITC-抗ヤギ抗体
(ウサギ) (Miles 社) を $1:40$ あるいは $1:100$ に希
釈して使用した。

(結 果)

1) モルモット胎生蝸牛における薬物移行

○ 妊娠前期 (胎生 33 ~ 39 日)

モルモット妊娠前期の胎仔においては、各回転はすでに形成されていた。下方回転においては、将来の鼓室階が形成され前庭階も形成されつつあったが、上方回転では蝸牛管のみが存在していた (Fig. 1)。上方回転の耳胞には、まだ外リンパ腔の形成は認められなかった。カナマイシン (K M) は蝸牛管の外リンパ腔組織系ならびに上皮下層に沿って認められたが、その量は蛍光強度からの推測では余り多くなかった。将来、蓋膜に相当する部位の細胞層は厚くなっており、その内腔側の蓋膜部には比較的多量の K M が認められたが、血管条やライスネル膜に相当する部位には K M の集積は認められなかった (Fig. 2, 3)。

コルチ器に相当する部位には、2 ~ 3 個の多層性細胞が認められすでに分化傾向を示し

ており、コルチ器上方には、蓋膜が観察された (Fig. 4)。

同時期の蝸牛管膜迷路を透過電子顕微鏡にて観察すると、コルチ器において外有毛細胞、内有毛細胞はすでに識別され、感覚細胞への移行が認められた。ヌエル氏腔は開きつつあり、ダイテルス細胞も認められ、その下方には、ラセン血管も認められたが、コルチトンネルは未だ開いていなかった (Fig. 5)。

コルチ器上方には将来、蓋膜になるべく物質が存在した。鼓室唇に相当すべき細胞は立方状を呈し、核は大きくミトコンドリアにも富み、上皮層の内腔側には微絨毛が存在した (Fig. 6)。

血管条に関しては、辺縁細胞、中間細胞、基底細胞がすでに識別され、その下方にはラセン靱帯が認められるが、毛細血管は観察されなかった (Fig. 7)。辺縁細胞の基底陥入はこの時期においては未だ形成されず、内リンパ腔側に面した胞体内にも、成獣で認めら

れる vesicle はほとんど観察されなかった
(Fig. 8)。

○ 妊娠中期 (胎生 44 ~ 46 日)

K M の蛍光は、ラセン縁から蓋膜部、また
コルチ器下部の基底板やラセン血管、ラセン
靱帯にも認められた (Fig. 9)。

この時期では、コルチ器はほぼ形成されてい
たが、コルチトンネルは未だ開いていなかった。
ラセン縁・蓋膜系にはかなりの K M の
集積が存在し、少量の K M が外有毛細胞にま
で達していた (Fig. 10)。

顕著な所見として多量の K M が、ラセン縁か
ら蓋膜および基底板に流れるがごとく移動し
ていた (Fig. 11)。

血管条やラセン靱帯にも K M は存在しており
、外ラセン溝の上皮下層には、かなりの K M
が認められた (Fig. 12)。

○ 妊 娠 後 期 （ 胎 生 5 5 日 以 降 ）

コルチトンネルはすでに開いており、コルチ器はほぼ完成され、成獣と同程度の形態を呈していた。KMは、妊娠中期と同様ラセン縁・蓋膜系に豊富に存在した。ラセン血管にもKMが認められたが、基底板にはほとんど認められなかった。このことは、妊娠中期の基底板にKMが多量に存在した事と対比的であった（Fig. 13, 14）。

2) 内耳膜迷路の分裂と分化

(A) Bromodeoxyuridine (BrdU)

○ 妊娠前期モルモット (胎生33～39日)

蝸牛において各回転はすでに形成されており、下方回転ほど分化発育程度が進んでいた。蝸牛管膜迷路におけるBrdUの取り込みは全回転において認められなかった (Fig. 15, 16)。同時期の酵素抗体法によるBrdU染色標本では将来のコルチ器相当部位や血管条、ライスネル膜の部位にはBrdUの取り込みは認められないが、迷路骨胞の細胞核には茶褐色に染色するBrdUの標識が著明であった (Fig. 17)。迷路骨胞周囲結合織の細胞核にもBrdUの存在が認められた (Fig. 18)。

透過電子顕微鏡による形態学的観察において、この時期のコルチ器には有毛細胞が識別されたことは前述のごとくである (Fig. 19)。将来、ライスネル膜に相当する部位においては、上方に前庭階、下方に内リンパ腔側を認める。すでに内リンパ腔側及び外リンパ腔

側に面する2つの細胞に識別され基底膜も存在した。前庭階において前庭階形成は未だ不全であり、類洞あるいは、毛細血管と思われるべき組織が存在し内腔には赤血球が認められた (Fig. 20)。ライスネル膜より内ラセン溝に向かう組織では、細胞は立方状を呈し、胞体内ではミトコンドリアの存在は著明ではなかった。一方、上皮下においてはラセン靱帯と同様の組織が観察された (Fig. 21)。血管条からラセン隆起に移行すると思われる部位においては、細胞の形は円柱状であり、大きな核が存在した。細胞間隙は血管条に比べて少ない傾向であった (Fig. 22)。

positive controlである肝細胞に関しては、妊娠前期、妊娠中期の全時期を通じて BrdU の肝細胞の核への取り込みが認められ肝細胞の分裂増殖が観察された (Fig. 23)。

○ 胎 生 1 4 日 マ ウ ス (F i g . 2 4)

この時期において蝸牛管は認めるものの、外リンパ腔（鼓室階及び前庭階）の形成は観察されなかった。管腔に近い上皮密集度の高い部位におけるいくつかの細胞は有糸分裂を行っているとし唆され、これらの細胞の一部は、有毛細胞及び血管条に発育する可能性があるが、光学顕微鏡下において識別する事は確認できなかった (F i g . 2 5) 。

APAAP法による観察においては、コルチ器及び血管条に相当する膜迷路の部位にはBrdUの取り込みは認められなかった (F i g . 2 6) 。

○ 胎 生 1 8 日 マ ウ ス

胎生18日になると頂回転におき鼓室階形成は未完成であるものの下方回転には、すでに前庭階、鼓室階の形成を認めた (F i g . 2 7) 。

ライスネル膜やコルチ器の識別は明らかとなり、コルチ器相当部位には上皮の肥厚が認められた。血管条の辺縁細胞においてはその

下方にある間葉細胞由来の細胞よりも染色性が高いことが観察された (Fig. 28)。

胎生 18 日の APAAP 染色法による観察では、将来のラセン縁相当部位において BrdU の取り込みが少量ながら認められ分裂時期であることが観察された。血管条においては BrdU は存在せず既に分裂が終了していると示唆された (Fig. 29)。

迷路骨胞の細胞核には顕著に BrdU の取り込みが認められた (Fig. 30)。

(B) 蝸牛外側壁における $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の

局在

○ 妊娠前期モルモット

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ は、蝸牛管上皮層基底部およびその下部組織に主として観察され、上皮細胞間隙にも認められたが、内リンパ腔側にはほとんど認められなかった。将来のライスネル膜に相当する部位には $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

は存在した (Fig. 31)。

○ 妊娠中期モルモット

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ は、妊娠前期と同じく蝸牛管上皮層基底部分、およびライスネル膜にも認められたが、血管条には認められなかった (Fig. 32)。

この時期の前庭階は大きく開大し、鼓室階も開きつつあった。ラセン隆起、外ラセン溝、ライスネル膜が明確となり、コルチ器の上皮は、2～3層の柱状の細胞で構成されていた。血管条はラセン靱帯から明確に識別された (Fig. 33)。

○ 妊娠後期モルモット

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ は妊娠後期において、明らかに蝸牛管外側壁の血管条辺縁細胞の基底部分から側壁部にかけての部位に観察された (Fig. 34)。DAB法においても蛍光抗体法と同様に血管条辺縁細胞と中間細胞との間の基

底陥入部に $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の局在が茶褐色に染色され、成獣と同レベルの形態を呈しているのが観察された (Fig. 35)。

成獣に関しては、過去の酵素組織学法の報告と同様に血管条辺縁細胞の基底陥入に強く $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ が存在した (Fig. 36)。

Positive controlである腎臓では、妊娠前期、妊娠中期、妊娠後期の全時期を通じて尿細管の基底部及び側壁部に $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の存在を認めた (Fig. 37)。

○ 生後1日マウス

この時期における $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ は、基板およびライスネル膜に認められたが、血管条にはその出現を認めなかった。形態学的には、血管条細胞は辺縁細胞、中間細胞、基底細胞に識別され、すでに分化に移行していたが、成獣に比べ辺縁細胞の基底陥入や中間細胞との間の interdigitation が未だ未完成であった (Fig. 38, 39)。

○ 生 後 7 日 マ ウ ス

生 後 7 日 に お い て も 未 だ 血 管 条 細 胞 に は 、
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の 存 在 は 認 め ら れ な か っ た が 、
ラ セ ン 靱 帯 に は 本 酵 素 の 活 性 が 観 察 さ れ た 。
辺 縁 細 胞 は 生 後 1 日 と 同 様 に 立 方 状 か ら 円 柱
状 を 呈 し て い た が 、 微 細 構 造 上 に お い て は 、
interdigitation が 比 較 的 形 成 さ れ つ つ あ っ
た (Fig. 40, 41)。

○ 生 後 1 4 日 マ ウ ス

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ は 、 血 管 条 辺 縁 細 胞 の 基 底
部 か ら 側 壁 部 に か け て の 基 底 陥 入 の 部 位 に お
い て こ の 時 期 よ り 出 現 し 始 め た 。 辺 縁 細 胞
は や や 扁 平 化 を 呈 し つ つ 、 辺 縁 細 胞 の 基 底 陥
入 や 中 間 細 胞 と の 間 の *interdigitation* な ら
び に 3 種 の 血 管 条 細 胞 は 、 微 細 形 態 学 的 に は
成 獣 と 同 程 度 の レ ベ ル ま で に 完 成 さ れ て い た
。 辺 縁 細 胞 は 基 底 陥 入 を 下 方 に 残 し た ま ま
細 胞 体 が 上 方 へ 移 行 し て い る の が 観 察 さ れ た
(Fig. 42, 43)。

○ 生 後 2 1 日 マ ウ ス

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の 存 在 が 血 管 条 に 顕 著 に 観
察 され た 。 す な わ ち 、 生 後 1 4 日 と 同 様 、 血
管 条 細 胞 の 中 間 層 付 近 に そ の 存 在 が 認 め ら れ
、 そ の 蛍 光 は 辺 縁 細 胞 の 基 底 陥 入 部 に 沿 っ て
観 察 され た (Fig. 44)。

(考 察)

(1) モルモット胎生蝸牛における薬物移行
母体自身の疾病治療目的、あるいは母体の
血流循環を通じて胎児の子宮内治療を行うた
めに、妊婦に薬剤を投与する必要性が生じる
ことがある。一方、妊娠期間の薬剤投与に
は、きわめて慎重な考慮を払う必要性がある
のは言うまでもない。その理由として、母
体と胎児双方に対して副作用を招く恐れがあ
るからである。

アミノグリコシド系薬物の耳毒性について
は、今まで多くの研究が行われてきたが¹⁷⁾
、胎児内耳に対する副作用、とりわけ内耳
への薬物分布についての報告は極めて少ない
^{18, 19, 20)}。しかし、母体へのアミノグ
リコシド系薬物治療を原因とする新生児の聴
覚または前庭の機能不全には、しかるべき配
慮を払う必要がある^{21, 22)}。

今回、未成熟内耳への薬物移行を検討する
ため、妊娠母獣へのカナマイシン(KM)投与

による胎児内耳へのアミノグリコシド系薬物の分布状況を免疫組織学的に観察を行った。胎仔は一般に、成獣より薬物の副作用に対し敏感であるため、我々臨床医は、胎児に催奇性または毒性を有する薬剤に対して細心の注意を払わなければならない。薬剤の胎仔への経胎盤経路には多くの要因が絡んでいる。Mirkin²³⁾によれば、薬剤の胎児への分布は薬剤の脂質溶解性、イオン化、分子量、胎盤血流量、薬剤の胎盤代謝、薬剤の蛋白結合、胎盤の老化、および胎児側の諸要因によって制限される。しかし、これらの薬物生態学上の規制を受けるにもかかわらず、多くの薬剤は胎盤を通過するといわれている²⁴⁾。Good and Johnsonら²⁵⁾は、妊娠後期におけるKMの経胎盤移行について報告している。また、妊娠中にストレプトマイシンによる結核治療を受けた母体から生まれた子供は、神経障害を起こしていたという報告がある^{21, 22)}。従って、成獣に対して耳毒性がある

ことが判明している薬剤はアミノグリコシド系薬物を含め、催奇性¹⁸⁾のみならず胎仔に対する耳毒性、とりわけ内耳への影響についても考慮しなければならない。

大迫ら¹⁹⁾は、マウスの聴覚機能が出現する時期に投与されたアミノグリコシド系薬物の外有毛細胞障害による聴覚機能低下を認めているが、同量の薬剤をこの期間の前後に投与してもこのような障害を起こさなかったと報告している。ラットについても同様の所見が報告されているが、それによると内耳は、この時期においてアミノグリコシド系薬物の副作用にきわめて敏感であることが実証されている²⁰⁾。

薬剤の内耳毒性の強さは、薬剤の濃度、投与時間および薬剤分布の選択性に依存する。成獣では、KMは比較的容易に内耳に達することができる²⁶⁾。

本研究では、母獣にKMを投与したところKMは、胎児内耳に比較的容易に到達してい

た。妊娠中期あるいは後期に投与したKMは、胎児内耳のラセン血管、蓋膜、および基底板に到達するのに30分も要しなかった。ラセン縁に多量のKMが存在することは、この部位に血液が豊富に供給されていることを示唆している²⁶⁾。すなわち、薬剤がコルチ器に到達する経路には2つのルートがあると考えられる。1つはラセン縁・蓋膜系の経路であり、もう一方は、ラセン血管系の経路である。妊娠初期にKMを投与した群で、血管条にKMがほとんど存在しない理由として、血管条毛細血管がこの時期には未だ形成されていないためであることが形態学的所見からも確認された。妊娠中期では、KMがコルチ器下部の基底板に多量に認められたことは、この時期ではKMが未だ、未完成の基底板をラセン縁からラセン靱帯に流れ、妊娠後期での基底板の成熟に伴いKMの進入が阻止されている可能性が考按される。

本研究の組織学的なKM検出による観察では、定量的見地より明確なことは言えない。しかし、胎仔内耳のKM蓄積量は成獣のコルチ器ほどは多くなかったため、薬剤が胎仔に対して耳毒性がきわめて強い理由は、腎臓からのKM排泄作用が胎仔期で劣ること²⁵⁾、あるいは、この段階の内耳のアミノグリコシド系薬物に対する感受性が高いためと推察される。

(2) 未成熟内耳における分裂と分化

ヒト内耳の発生については、Bast and Anson²⁷⁾、Anson and Donaldson²⁸⁾、Altmann²⁹⁾、により明確にされている。すなわち、胎生3週で頭部後方両側に外胚葉の板状の層である耳板 (otic placode) が発生し、耳窩 (otic pit) に移行する。胎生4週で耳胞 (otocyst) となり内リンパ迷路が完成する。

外リンパ腔は未だ完成されず、胎生4～5

週で内リンパ管、及び球形囊、卵形囊となる部位が生じ、6週頃に半器管が形成され、蝸牛の回転がはじまる。7週には前庭は球形囊、卵形囊に分化し9週で蝸牛は2回転半となる。12週目頃にラセン器が生じはじめ、膜迷路はほぼ成人の形状を呈するようになる。15週目頃に膜迷路周囲の軟骨が骨化しはじめ、胎生24週に内耳は完成する。ただしこれをもって聴覚の発生が完遂されたわけではない。これらは末梢受容器である内耳の完成であり中枢側は新生児とて未だ完成されていない。すなわち、Dekaban²⁹⁾によれば新生児では大脳聴覚領野への投射繊維の髄鞘形成はほとんど未完成であり、新生6カ月で脳幹の髄鞘形成は完成し、12カ月で大脳の第1次投射繊維の髄鞘はほとんど形成され、24カ月で大脳への投射路はすべて髄鞘化されて聴覚の完成が起こる。

さてヒトでは、このように新生児期にはすでに内耳組織は完成されているが、マウス

30)、ウサギ^{12, 13)}では未完成のまま出生し、その後徐々に完成される。一方、モルモットの内耳発生はヒトと類似し、出生時には内耳の形成は終了しているため、ヒトの内耳発生モデルとして検討してみた。

Bromodeoxyuridine (BrdU) は、thymidine の analog であり、S 期の細胞核にのみ取り込まれるため細胞の分裂を観察するには、アイソトープを使う繁雑さがなかったため、汎用されている^{31, 32, 33)}。各時期の妊娠モルモットに BrdU を投与したところ、蝸牛骨胞の細胞核に取り込まれたことは、同部の分裂、増加を意味していると思われるが、各時期のすべての蝸牛管膜迷路には全くその取り込みが認められなかった。すなわち、今回の検討による妊娠前期モルモット(胎生 33 ~ 39 日)ではすでに、膜迷路の分裂は終了していたことになる。透過電子顕微鏡による微細形態学的にも将来のコルチ器相当部位は、内有毛細

胞や外有毛細胞が識別でき、蓋膜もすでに形成されていた。すなわち、モルモットにおいては胎生33～39日にはすでにコルチ器相当部位の分裂は終了していたことになる。手技上の面から、今回よりより初期のモルモットの内耳が獲得できなかったため、内耳発生過程においてその膜迷路にBrdUの標識ができなかったこと、および種差を考慮に入れるため、胎生14日～出生21日までのマウスを用いて同様の検討を行ってみた。

マウスを使用した内耳発生の研究はモルモットに比して多い(4, 11, 16, 30, 34, 35, 36)。

Sher¹⁶⁾のCBA-J/CBA-Jのマウスを用いての内耳の発生と分化の報告では、胎生18日目で基底回転において前庭階、鼓室階が形成され生後2日で頂回転にまで達している。

Otocystの形成からも当然のことであるが、蝸牛の発生においてはまず内リンパ腔が形成され、次いで外リンパ腔が形成、また基底回転の方が頂回転に比べ発生的には古いため、

その成熟度が先行する。

今回の検討では、胎生14日目では基底回転においても外リンパ腔は形成されていなかった。胎生18日目の基底回転では前庭階、鼓室階はすでに形成され、中央回転では鼓室階がほとんど形成されていたが、前庭階は形成過程であった。しかし頂回転においては前庭階、鼓室階はほとんど形成されていなかった。

外有毛細胞に聴覚レセプターの繊細なチューニング機構があると信じられている現在、高音部のチューニングに関与する基底回転が個体発生学的に古いという事実は、系統発生学的に何を意味するのであろうか。哺乳類においては、小動物においてほど高音域での感知周波数がヒトに比べて高いが、低音域においてはあまり差がない³⁵⁾。有毛細胞においては、内有毛細胞が外有毛細胞よりも早く成熟する^{36, 37)}。しかも内有毛細胞が形態学上、外有毛細胞に比べてより primitive な

レセプターと想像されることは、音感知範囲の差は内有毛細胞の数の差というよりは、外有毛細胞の機能の程度にその責任がある可能性がある。出生時、未だ未成熟のままであるマウスやウサギなどは、成熟内耳で出生するヒトやモルモットよりもさらに内耳、特に外有毛細胞の高機能分化が進むのかも知れない。

一方、同マウス胎生コルチ器においては¹⁶⁾、基底回転における基底に近い1/3の部分において、胎生17日目で3列の外有毛細胞と1列の内有毛細胞が認められている。胎生19日目では、全回転において外有毛細胞、内有毛細胞が認められている。Anniko¹¹⁾は、CBA/CBAマウスにおいて、胎生15日目で有毛細胞が識別可能になり、胎生14日目でもすでにその兆候が現れているという。Ruben³⁴⁾によれば、胎生14日で85-87%の蝸牛有毛細胞は最後の分裂を行うが、21-25%のものは胎生13日目で分裂を行うという。

今回の著者の検討では、胎生14日目ではコルチ器相当部位の細胞にほとんどBrdUの取り込みが認められなかったが、胎生18日目では明らかにラセン縁の部位の細胞においてその取り込みが認められた。Sher¹⁶⁾も胎生18日目で基底回転、19日目で中央回転が形成され始め、出生1日目で全回転の分化が終了すると報告しており、今回のBrdUの取り込みからみた著者の報告もこれを支持する。

以上のことよりコルチ器において、感覚細胞は胎生14日以前すなわち13日前後にS期があり、その後は分化に移行する。

聴覚の発現は、Alford³⁸⁾、大迫ら¹⁹⁾によれば生後9～15日目であり、形態学的にはKikuchi⁴⁾らは、出生10日目頃に遠心神経終末のコルチ器への出現にてその分化の終了を観察していることより、その頃を境として聴覚の出現基盤が出来上がったことになる。

耳胞上皮が感覚細胞へ分化する機転に関し

ては神経支配説³⁹⁾、間葉組織説⁴⁰⁾、基底膜関与説⁴¹⁾などがある。Van De Water^{14, 15)}のマウスの *in vitro* の研究では、感覚上皮への分化は神経支配に関係せず進行しており興味深い。ヒトにおいては内耳神経節からの神経支配を受けた上皮に感覚上皮としての分化成熟が急速に進行すると言う報告⁴²⁾もあり、今後のさらなる検討が必要であろう。

血管条においてはモルモットの場合、妊娠前期においてすでに、血管条相当部位には立方状から円柱状の辺縁細胞が認められ、基底細胞、中間細胞の存在も認められた。辺縁細胞の基底陥入はほとんど認められなかったが、3つの血管条細胞が識別されたこと、および BrdU が同部位に標識されなかったことは、血管条でもその分裂は妊娠前期(33~39日)で終了していたことを意味する。そこで、血管条分化の検討を膜迷路酵素である Na⁺-K⁺-ATPase の出現様式から検討してみた。

その結果、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ は妊娠前期、妊娠中期には認められず、妊娠後期（胎生55日以降）になって初めて、辺縁細胞を中心とした血管条細胞に認められた。このことは、いわゆる辺縁細胞の基底陥入部位に蝸牛内静止電位（EP）の源が出現していることを示唆している。上野⁴³⁾らも形態学的見地からモルモット胎生49日で蝸牛下方回転ですでに内リンパの生成、EPの発生の可能性を報告している。

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の内耳発生過程における出現の観察は鶏胚でも行われており^{44, 45)}、Yoshihara⁴⁵⁾らはHamburger and Hamilton⁴⁶⁾の分類でステージ41～42になってその出現をTegmentum Vasculosumのdark cellに認めている。すなわち、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ が血管条を含めて内耳のdark cellに出現するのは、同部位が分裂が終了した直後ではなく、しばらく経過してからのち、検知出来るほどに出現していることを意味している。

一方、マウスの場合においては胎生14～21日目までを通じて血管条相当部位にBrdUの取り込みが観察されなかったが、このことは血管条がコルチ器より先行して分裂を終了していたことを意味する。

Sher¹⁶⁾によれば血管条の分化は胎生17日目より始まり、生後10日目で成獣の形態を示している。

著者は、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の出現時期を検討してみたところ、生後14日目になって血管条の辺縁細胞の基底陥入に出現し始め、21日目には成獣のそれと匹敵していた。電子顕微鏡学的観察にも辺縁細胞の基底陥入は生後14日目でかなり豊富になっており、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ と辺縁細胞の豊富な基底陥入の出現時期がほぼ同一時期であることが判明した。

モルモット血管条に妊娠後期（胎生55日以降）、マウス血管条に生後14日目になって初めて $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ が出現したことはそ

れより以前に分化に移行した血管条にこの時期になって初めてEP産生というその主たる機能遂行のための基礎が出来上がったことを意味している。

さて、そのEP出現時期については種々の動物により検討されているが^{30・47・48}、EP出現以前にすでに内リンパ液には高K、低Naという成獣の内リンパイオン組成が形成されていると報告されている⁴⁹。

Ryanら⁵⁰のスナネズミの報告では、出生10日目にはすでに内リンパ液のイオン組成はほぼ完成されており、血管条においては、10～18日目の間に亜リン酸基が増量し、同時期から約2日遅れてEPがそれと同じ様式で増大することが認められている。大村⁵¹、加納ら⁵²もモルモットでEP出現以前の胎生49日に内リンパ液のイオン組成の完成を認めており、この時期に認められたnegative EPが胎生62日になり急激にpositive EPに変わると報告している。

今回、著者の検討においても $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ はその聴覚発現時期に一致して血管条辺縁細胞に認められており、この時期に血管条の分化の終了、機能の完成が起こることが判明した。

Positive EPの出現以前および、辺縁細胞に $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 出現以前に内リンパ液組成は完成されており、このことは、大村ら⁵¹⁾の報告の胎生61日以前のnegative EPは内リンパ液の高Kイオンの拡散電位が一部には関係していることを示唆している。また、Mikaelianら³⁰⁾によれば、マウスのEP発生の時期は生後11～14日であるため、内、外リンパ液の電解質が固有の組成をとるのはマウスにおいてもEPが発生する以前と考えられている。

血管条機能完成以前の、内耳液イオン組成の形成機転に関して Annikoら⁵³⁾はCBA/CBAマウスで検討しているが、それによれば、胎生16～19日目の蝸牛および前庭部に、出生

1 ～ 6 日 目 の 蝸 牛 管 の 外 側 壁 膜 迷 路 に お い て
2 時 期 の *adenylate cyclase* の 豊 富 な 出 現 を
み て お り 、 EP 出 現 以 前 の こ の 内 リ ン パ 組 成 の
生 成 に は 胎 生 期 の 同 酵 素 が 関 与 し て い る の で
は な い か と 考 察 し て い る 。

著 者 の 検 討 で は 、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ は 、 妊 娠
前 期 、 中 期 の モ ル モ ッ ト に 、 ま た 、 生 後 1 日
、 7 日 の マ ウ ス の コ ル チ 器 基 底 膜 下 部 、 お よ
び ラ イ ス ネ ル 膜 に 認 め ら れ 、 血 管 条 に 認 め ら
れ な か っ た 。 こ の 基 底 膜 下 部 、 お よ び ラ イ ス
ネ ル 膜 の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の 存 在 が 、 未 成 熟 内
耳 の 内 リ ン パ 組 成 の 形 成 を 行 っ て い る 可 能 性
が あ る と 思 わ れ る が 、 詳 細 に は 今 後 の 検 討 が
必 要 で あ る 。

鳥 類 以 前 の 内 耳 有 毛 細 胞 に 再 生 能 力 が あ る
と い う 報 告^{54, 55)} は 、 今 ま で の 内 耳 研 究 に 大
き な 衝 撃 を 与 え た 。 す な わ ち こ の こ と は 、
鳥 類 以 前 で は 内 耳 感 覚 細 胞 に *turn over* が あ
る と い う こ と で あ り 、 哺 乳 類 の 内 耳 に お い て

も、発生学的に蝸牛よりより古い前庭系においては、変性後の再生能力を有する可能性も否定できない。

今回の著者の検討は、今後の哺乳類内耳感覚細胞の再生能検討の一助ともなるものであり、この命題は今後、検討されるべき課題である。

(参 考 文 献)

- 1) Bast, T. H. and Anson, B. J.: The temporal bone and the ear. Charles C. Thomas, Springfield. (1949).
- 2) Altmann, F.: Normal development of the ear and its mechanics. Arch Otolaryngol. 52: 725-766 (1950)
- 3) Bredberg, G.: Cellular pattern and nerve supply of the human organ of Corti. Acta Otolaryngol. (Stockh) Suppl 236: 10-74 (1968).
- 4) Kikuchi, K. and Hilding, D.: The development of the organ of Corti in the mouse. Acta Otolaryngol. (Stockh) 60: 207-222 (1965).
- 5) Igarashi, Y.: Cochlea of the human fetus: A scanning electron microscope study. Arch Histol. Jap. 43: 195-209 (1980).

- 6) Igarashi, Y. and Ishii, T.: Embryonic development of the human organ of Corti. Electron microscopic study. Int. J. Ped. Otolaryngol. 2:51-62 (1980)
- 7) Igarashi, Y.: Ontogeny of human inner ear: A scanning electron microscope study. Biomed. Res. 2, Suppl :427-432 (1978).
- 8) Anniko, M., Van De Water, T.R. and Nordemar, H.: Organ culture of the 16th gestation day mouse labyrinth. A model suggestion for pre- and post partum development. Acta Otolaryngol (Stockh) 86:52-55 (1978).
- 9) Anniko, M., Nordemar, H. and Van De Water, T.R.: Development and differentiation of the mammalian crista ampullaris in vivo and vitro. Arch Otorhinolaryngol. 224:285-299 (1979).

- 10) Anniko, M.: Development of otoconia.
Am J Otolaryngol.: 400-410 (1980).
- 11) Anniko, M.: Cytodifferentiation of
cochlear hair cells. Am J Otolaryngol.
4: 375-388 (1983).
- 12) Nakai, Y. and Hilding, D.: Cochlear
development. Some electron microscopic
observations of maturation of hair
cells, spiral ganglion and Reissner's
membrane. Acta Otolaryngol. (Stockh)
66: 369-385 (1968).
- 13) Nakai, Y.: The development of the sensory
epithelium of the cristae ampullaris
in rabbit. Pract Otorhinolaryngol
32: 268-278 (1970).
- 14) Van De Water, T.R.: Effect of removal
the statoacoustic ganglion complex
upon the growing otocyst. Ann Otol
Rhinol Laryngol. 85: (Suppl 33): 1-32
(1976).

- 15) Van De Water, T.R. and Rubin, R.J.:
A possible embryonic mechanism for
the establishment of innervation of
inner ear sensory structures. Acta
Otolaryngol. (Stockh) 95:470-479 (198
3).
- 16) Sher, A.E.: The embryonic and postna-
tal development of inner ear of the
mouse. Acta Otolaryngol. (Stockh).
Suppl 285:1-77 (1971).
- 17) Lerner, S.A., Matz, G.J., Hawkins, J.E.
, eds.: Aminoglycoside ototoxicity.
Boston: Little, Brown and Company.
(1981).
- 18) Anniko, M.: Effects of gentamycin on
the development of the embryonic
inner ear in organ culture. In:
Lerner, S.A., Matz, G.J., Hawkins, J.E.
, eds.: Aminoglycoside ototoxicity.
Boston: Little, Brown and Company.

- 215-227 (1981).
- 19) Osako, S., Tokimoto, T., Matsura, S.:
Effect of kanamycin on the auditory
evoked response during postnatal
development of the hearing of the
rat. *Acta Otolaryngol. (Stockh)*
88:359-368 (1979).
- 20) Nakai, Y., Chang, K.C., Ohashi, K.,
Morisaki, N.: Ototoxic effect of an
aminoglycoside drug on immature
inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)*
Suppl 393:1-5 (1983).
- 21) Robinson, G.C., Cambon, K.G.: Hearing
loss in infants of tuberculous
mothers treated with streptomycin
during pregnancy. *N. Engl. J. Med.*
271:949-951 (1964).
- 22) Conway, N., Birt, B.D.: Streptomycin
in pregnancy. Effect on the foetal
ear. *Br. Med. J.* 2:260-263 (1965).

- 23) Mirkin, B.L.: Maternal and fetal distribution of drugs in pregnancy.
Clin Pharmacol Ther 14:643-647 (1973)
- 24) Sereni, F., Cislighi, G.U., Gervasoni, A.: Developmental pharmacology.
In: Davis, J.A., Dobbing, J., eds.: Scientific foundations of pediatrics.
London: William Heinemann Medical Books.: 1066-1078 (1981).
- 25) Good, R.G., Johnson, G.H.: The placental transfer of kanamycin during late pregnancy. Obstet Gynecol. 38:60-62 (1971).
- 26) Yamane, H., Nakai, Y., Konishi, K.: Furosemide-induced alternation of drug pathway to cochlea. Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl 447:28-35 (1988).
- 27) Bast, T.H. and Anson, B.J.: Developmental anatomy of the ear. In: Shambaugh, G.E. ed. Surgery of the ear. W.B.

- Saunders Company, Philadelphia,
London. 5-39(1967).
- 28) Anson, B.J. and Donaldson, J.A.: Surgical anatomy of the temporal bone.
W.B. Saunders Company, Philadelphia,
London, Toront. (1981).
- 29) Dekaban, A.: Neurology of infancy.
Williams and Wilkins, Baltimore,
(1959).
- 30) Mikaelian, D. and Ruben, R.J.: Development of hearing in the normal CBA-J mouse : Correlation of physiological observations with behavioral responses and with cochlear anatomy.
Acta Otolaryngol. (Stockh) 59:451-461
(1964).
- 31) 磯部宏、伊藤正美、清水透、水野重孝、
堂坂弘俊、荒谷義和、宮本宏、川上義和
: 抗 Br d U 抗体を用いた細胞動態の解析
Oncologia 20-3:136-143(1987).

- 32) Tada, T., Kodama, T., Watanabe, S., Sato, Y. and Shimosato, Y. Immunohistochemical cell kinetic study of human lung cancer by using monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. Jpn J Clin Oncol 16(2):129-135(1986).
- 33) Risio, M., Coverlizza, S., Ferrari, A., Candelaresi, G.L. and Rossini, F.P.: Immunohistochemical study of epithelial cell proliferation in hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinoma of the large bowel. Gastroenterology 94:899-906(1988).
- 34) Ruben, R.J.: Development of the inner ear of the mouse: A radioautographic study of terminal mitoses. Acta Otolaryngol. (Suppl) 220:1-44(1967).
- 35) Rubel, E.W., Born, D.E., Deitch, J.S. and Durham, D.: Recent advances toward understanding auditory system devel-

- opment. In: Hearing science, Charles, B.ed. College-Hill Press. San Diego, California. (1984).
- 36) Anniko, M.: Postnatal maturation of cochlea sensory hairs in the mouse. Anat Embryol. 166:355-368 (1983).
- 37) 小出郁夫: 走査型電子顕微鏡によるヒト胎児ラセン器の発生学的研究 耳鼻 34:476-487 (1988).
- 38) Alford, B.R. and Ruben, R.J.: Physiological behavioral and anatomical correlates of the development of hearing in the mouse. Ann Otol Rhinol Laryngol 72:237-247 (1963).
- 39) Friedman, I.: The innervation of the developing fowl embryo otocyst in vivo and in vitro. Acta Otolaryngol (Stockh) 67:224-238 (1969).
- 40) Orr, M.F.: Histogenesis of sensory epithelium in reaggregates of disso-

- ciated embryonic chick otocysts.
 Develop Biol. 17:39-54 (1968).
- 41) O'Rahilly, R.: The early development of the otic vesicle in staged human embryos. J. Embryol exp Morphol 11: 741-755 (1963).
- 42) 園部紀子: ヒト内耳の組織発生学的研究 - 感覚上皮の分化と神経支配の影響について - 日耳鼻. 88:330-337 (1985).
- 43) 上野陽之助、キャサリン・スミス: モルモット血管条の発達 内耳生化学 9: 43-44 (1978).
- 44) Schneider, M.E., Cotanche, D.A., Fambrough, D.M., Saunders, J.C., Matschinsky, F.M.: Immunocytochemical and quantitative studies of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ ase distribution in the developing chick cochlea. Hear. Res. 31:39 (1987)
- 45) Yoshihara, T., Igarashi, M. and Fermi-
 n, C.D.: Ultracytochemical localizati-

- on of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in the tegmentum vasculosum of the developing chick cochlea. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 110:366-373 (1990).
- 46) Hamburger, V., Hamilton, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 49-92 (1951).
- 47) Crowley, D. and Hepp-Raymond, M.D.: Development of cochlear function in the ear of the infant rat. *J. Comp Physiol Psychol* 62:427-432 (1966).
- 48) Pujol, R. and Hilding, D.: Anatomy and Physiology of the onset of auditory function. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 76:1-10 (1973).
- 49) Anniko, M. and Wroblewski, R.: Elemental composition of the developing inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 90:25-32 (1981).

- 50) Ryan, A.F. and Woolf, N.K.: Energy
dispersive X-ray analysis of inner
ear fluids and tissues during the
ontogeny of cochlear function.
Scanning Electron Microscopy: 201-207
(1983).
- 51) 大村正樹、Raphael, Y、八木伸也、加納 -
直行、牧本一男: モルモット胎児蝸牛の
発達における機能的ならびに形態学的側
面 耳鼻臨床 76: 増1: 399-406 (1983)
- 52) 加納直行、Raphael, Y、大村正樹、深沢 -
達也、廣野喜信、牧本一男: モルモット
の発達段階における内耳液電解質濃度
耳鼻臨床 77: 785-792 (1984).
- 53) Anniko, M., Spangberg, M.L. and Schac-
ht, J.: Adenylate Cyclase activity in
the fetal and the early postnatal
inner ear of the mouse. Hear. Res. 4:
11-22 (1981).

- 54) Cotanche, D.A.: Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. Hear. Res. 30:181-196 (1987).
- 55) Girod, D.A., Duckert, L.G. and Rubel, E.W.: Possible precursors of regenerated hair cells in the avian cochlea following acoustic trauma. Hear. Res. 42:175-194 (1989).

(付 図 説 明)

Fig. 1 胎生 33 ~ 39 日 モルモット 蝸 牛 の 光 学
顕 微 鏡 像

各 回 転 は す で に 形 成 さ れ て い る 。 下
方 回 転 で は 、 鼓 室 階 は 形 成 さ れ 、 前
庭 階 も 形 成 さ れ つ つ あ る 。

Fig. 2 胎生 33 ~ 39 日 モルモット 蝸 牛 へ の K
M 移 行 (蛍 光 顕 微 鏡 像)

3 つ の 蝸 牛 管 が 認 め ら れ る 。 K M は
外 リ ン パ 腔 組 織 系 (P) に び ま ん 性 に
存 在 し て い る 。

Fig. 3 Fig. 2 と 同 条 件 の 蛍 光 顕 微 鏡 像

K M は 、 上 皮 下 層 や 上 皮 間 隙 に 沿 っ
て 、 ま た 将 来 の 蓋 膜 と な る 部 位
(矢 印) に 存 在 し て い る 。

Fig. 4 Fig. 3 と 同 時 期 蝸 牛 の 光 学 顕 微 鏡 像

(H & E 染 色)

コ ル チ 器 上 方 に は 蓋 膜 が 認 め ら れ る
(矢 印) 。

Fig. 5 胎生33～39日モルモット蝸牛の透過電子顕微鏡像

外有毛細胞(O)、内有毛細胞(I)が認められるが、コルチトンネルは開いていない。

Fig. 6 Fig. 5と同条件の透過電子顕微鏡像
コルチ器上方部には、将来蓋膜となる物質(矢印)が存在する。

Fig. 7 Fig. 5と同条件の透過電子顕微鏡像
血管条には、辺縁細胞(M)、中間細胞(I)、基底細胞(B)が識別される。

Fig. 8 Fig. 5と同条件の透過電子顕微鏡像
辺縁細胞の基底陥入はまだ存在していない。

Fig. 9 胎生44～46日モルモット蝸牛へのKM移行(蛍光顕微鏡像)

コルチ器はほぼ形成されるが、コルチトンネルはまだ開いていない。

KMがラセン縁(S)、蓋膜(T)及び基底板(B)に沿って認められる。

Fig. 10 Fig. 9 の 高 倍 像

コルチ器下部の基底板およびラセン血管（矢印）にKMが存在する。

Fig. 11 Fig. 9 と 同 条 件 の 蛍 光 顕 微 鏡 像

多量のKMが、ラセン縁（S）から蓋膜（T）および基底板（B）に流れるがごとく認められる。

Fig. 12 Fig. 9 と 同 条 件 の 蛍 光 顕 微 鏡 像

KMは、血管条（SV）及びラセン靱帯（SL）に存在する。

Fig. 13 胎生55日以降モルモット蝸牛への
KM移行（蛍光顕微鏡像）

KMはラセン縁・蓋膜系、ラセン血管系に豊富に認められる。コルチトンネル（矢印）は既に開いている。

Fig. 14 Fig. 13 の 高 倍 像

ラセン血管（S）にはKMが認められるものの、基底板（B）にはほとんど認められない。外有毛細胞（O）、内有毛細胞（I）にも存在する。

Fig. 15 胎生33～39日モルモット蝸牛の光学顕微鏡像

各回転は形成され、下方回転では鼓室階（矢印）が形成されつつある。

Fig. 16 Fig. 15と同時期蝸牛のBrdUの分布（蛍光顕微鏡像）

蝸牛管膜迷路にはBrdUは認められない。

Fig. 17 Fig. 15と同時期蝸牛のBrdUの分布（DAB法）

蝸牛管膜迷路にはBrdUの存在が認められないが、迷路骨胞（矢印）には茶褐色に染色するBrdUが認められる。

Fig. 18 Fig. 15と同時期迷路骨胞のBrdU分布（蛍光抗体法）

迷路骨胞周囲結合識の細胞核（矢印）にBrdUの存在が認められる。
同部は、強い分裂状態であると示唆される。

Fig. 19 Fig. 15 と 同 時 期 蝸 牛 の 透 過 電 子 顕 微
鏡 像

O: 外 有 毛 細 胞

I: 内 有 毛 細 胞

Fig. 20 Fig. 15 と 同 時 期 蝸 牛 の ラ イ ス ネ ル 膜
透 過 電 子 顕 微 鏡 像

上 方 は 前 庭 階 、 下 方 に は 内 リ ン パ 腔
側 を 認 め る 。 前 庭 階 に お い て は 、 類
洞 様 構 造 の 中 に 血 球 を 認 め る 。

Fig. 21 Fig. 15 と 同 時 期 蝸 牛 の 内 ラ セ ン 溝 透
過 電 子 顕 微 鏡 像

細 胞 は 立 方 状 を 形 成 し 、 上 皮 下 に
お き ラ セ ン 靱 帯 と 同 様 の 組 織 が 観
察 さ れ る 。

Fig. 22 Fig. 15 と 同 時 期 蝸 牛 の 血 管 条 ラ セ ン
隆 起 移 行 部 の 透 過 電 子 顕 微 鏡 像

細 胞 は 円 柱 状 を 呈 し 、 大 き な 核 が 存
在 す る 。

Fig. 23 同 時 期 の p o s i t i v e c o n t r o l で あ る 肝
臓 に お け る B r d U の 分 布 (D A B 法)

肝 細 胞 の 核 に 存 在 が 認 め ら れ る 。

Fig. 24 母 獣 よ り 摘 出 し た マ ウ ス 胎 仔

左 : 胎 生 1 1 日 マ ウ ス

右 : 胎 生 1 4 日 マ ウ ス

Fig. 25 胎 生 1 4 日 マ ウ ス の 光 学 顕 微 鏡 像

(H & E 染 色)

内 リ ン パ 腔 (矢 印) は 形 成 さ れ る も
の の 、 外 リ ン パ 腔 は 形 成 さ れ て い な
い 。

Fig. 26 Fig. 25 と 同 時 期 蝸 牛 に お け る B r d U の
分 布 (A P A A P 法)

蝸 牛 管 膜 迷 路 に は B r d U は 認 め ら れ な
い 。

Fig. 27 胎 生 1 8 日 マ ウ ス の 光 学 顕 微 鏡 像

(H & E 染 色)

上 方 回 転 で は 鼓 室 階 が 形 成 さ れ て い
な い が 、 下 方 回 転 で は 鼓 室 階 、 前 庭
階 は 形 成 さ れ つ つ あ る 。

Fig. 28 Fig. 27の高倍像

コルチ器 (C)、ライスネル膜 (R) は認められる。前庭階、鼓室階は形成され、コルチ器相当部位には上皮の肥厚が認められる。

Fig. 29 Fig. 27と同時期蝸牛におけるBrdUの分布 (APAAP法)

ラセン縁相当部位 (矢印) にBrdUが存在する。

Fig. 30 Fig. 27と同時期迷路骨胞におけるBrdUの分布 (APAAP法)

迷路骨胞の細胞核 (矢印) にはBrdUが認められ、骨細胞の分裂状態である。

Fig. 31 胎生33～39日モルモット蝸牛の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の分布 (蛍光顕微鏡像)

蝸牛管上皮層基底部 (矢印)、ライスネル膜 (R) に $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ が認められる。蓋膜 (T) には、非特異的蛍光を有している。

Fig. 32 胎生 44 ~ 46 日 モルモット コルチ器 及
び 血 管 条 の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の 分 布
(蛍 光 顕 微 鏡 像)

蝸 牛 管 上 皮 層 基 底 部 (B) に は 認 め ら
れ る が 血 管 条 (SV) に は 検 出 さ れ な い

Fig. 33 Fig. 32 と 同 時 期 蝸 牛 の 光 学 微 鏡 像
(H & E 染 色)

コ ル チ 器 相 当 部 位 や 血 管 条 相 当 部 位
が 明 ら か に 識 別 さ れ る 。

Fig. 34 胎 生 55 日 以 降 モ ル モ ッ ト 血 管 条 の
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の 分 布 (蛍 光 顕 微 鏡
像)

辺 縁 細 胞 (M) の 基 底 部 よ り 側 壁 部 に
か け て 認 め ら れ る 。

Fig. 35 Fig. 34 と 同 時 期 血 管 条 の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$
ase の 分 布 (DAB 法)

辺 縁 細 胞 と 中 間 細 胞 と の 間 の 基 底 陥
入 (矢 印) に 認 め ら れ る 。

Fig. 36 成獣モルモット血管条の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の分布 (蛍光顕微鏡像)

血管条辺縁細胞の基底陥入 (矢印) に顕著に認められる。

Fig. 37 Fig. 34 と同時期の positive control である腎臓における $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の分布 (蛍光顕微鏡像)

尿細管及び側壁部に分布している。

Fig. 38 生後1日マウス血管条の透過電子顕微鏡像

成獣に比べ辺縁細胞の基底陥入や中間細胞との interdigititation が未完成である。

Fig. 39 Fig. 38 と同時期血管条の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の分布 (蛍光顕微鏡像)

血管条 (矢印) にはまだ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ が存在しない。

Fig. 40 生後7日マウス血管条の透過電子顕微鏡像

微細構造上、辺縁細胞の基底陥入

(矢 印) は 形 成 さ れ つ つ あ る 。

Fig. 41 Fig. 40 と 同 時 期 血 管 条 の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の 分 布 (蛍 光 顕 微 鏡 像)

血 管 条 (SV) に は 存 在 し な い が 、 ラ セ ン 韌 帯 (SL) に は 認 め ら れ る よ う で あ る 。

Fig. 42 生 後 14 日 マ ウ ス 血 管 条 の 透 過 電 子 顕 微 鏡 像

辺 縁 細 胞 (M) は 扁 平 化 を 形 成 し 、 辺 縁 細 胞 の 基 底 陥 入 、 中 間 細 胞 と の interdigitation 及 び 血 管 条 細 胞 は 、 形 態 学 的 に は 成 獣 と 同 レ ベ ル ま で に 完 成 さ れ て い る 。

Fig. 43 Fig. 42 と 同 時 期 血 管 条 の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の 分 布 (蛍 光 顕 微 鏡 像)

辺 縁 細 胞 の 基 底 陥 入 (矢 印) に 出 現 し 始 め た 。

Fig. 44 生 後 21 日 マ ウ ス 血 管 条 の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の 分 布 (蛍 光 顕 微 鏡 像)

こ の 時 期 に な る と 辺 縁 細 胞 の 基 底 陥

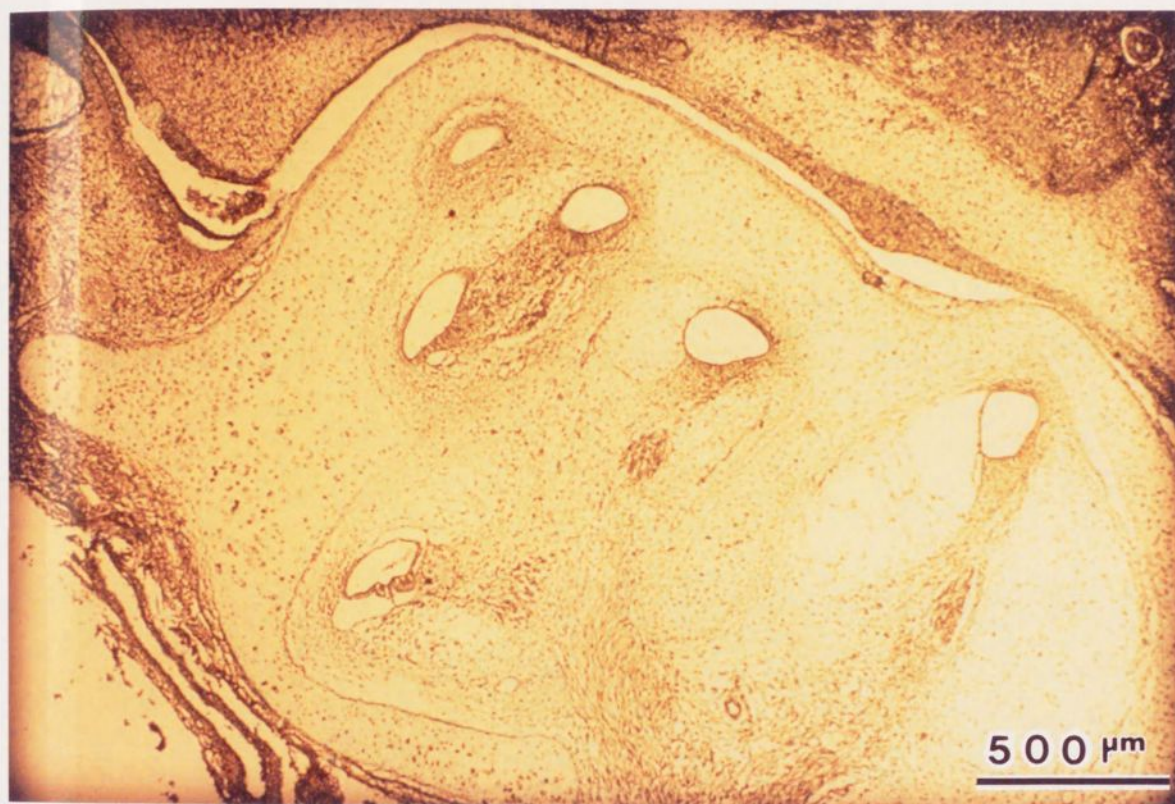
入（矢印）において $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ は、顕著に検出される。

Fig. 45 マウスにおける $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ の発現様式

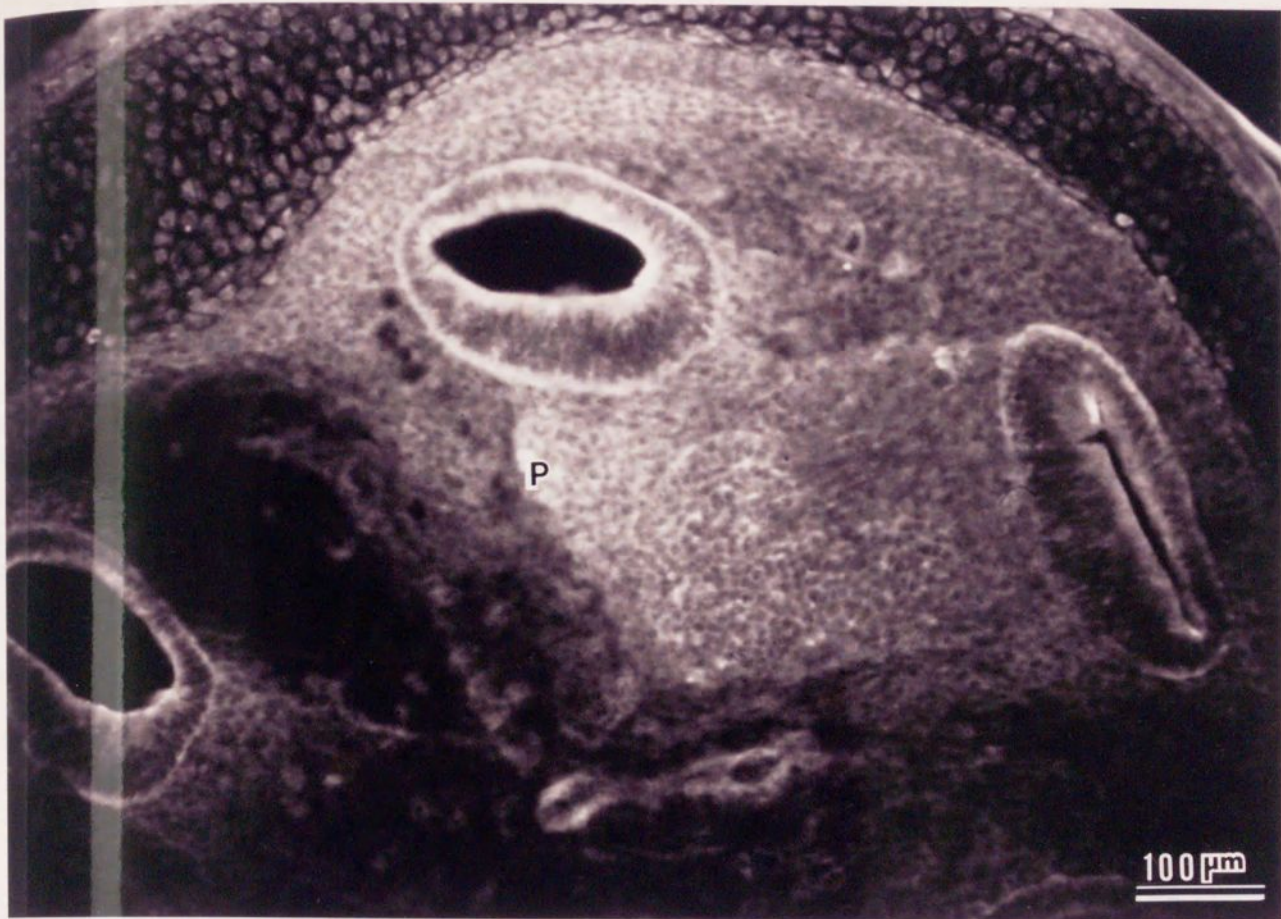
生後1日、生後7日においては辺縁細胞はまだ円柱状ないし立方状を認め、中間細胞との基底陥入は未発達である。生後14日になると辺縁細胞は、やや扁平化傾向を認め基底陥入も形成され、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ がこの時期より基底陥入部（赤線部）に出現し始める。

謝 辞

稿を終わるに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師中井義明教授に深甚なる謝意を表します。また実験の当初より御助言、御協力を頂きました山根英雄講師、小西一夫助手、井口広義学士および種々の御協力を頂きました本学耳鼻咽喉科学教室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。



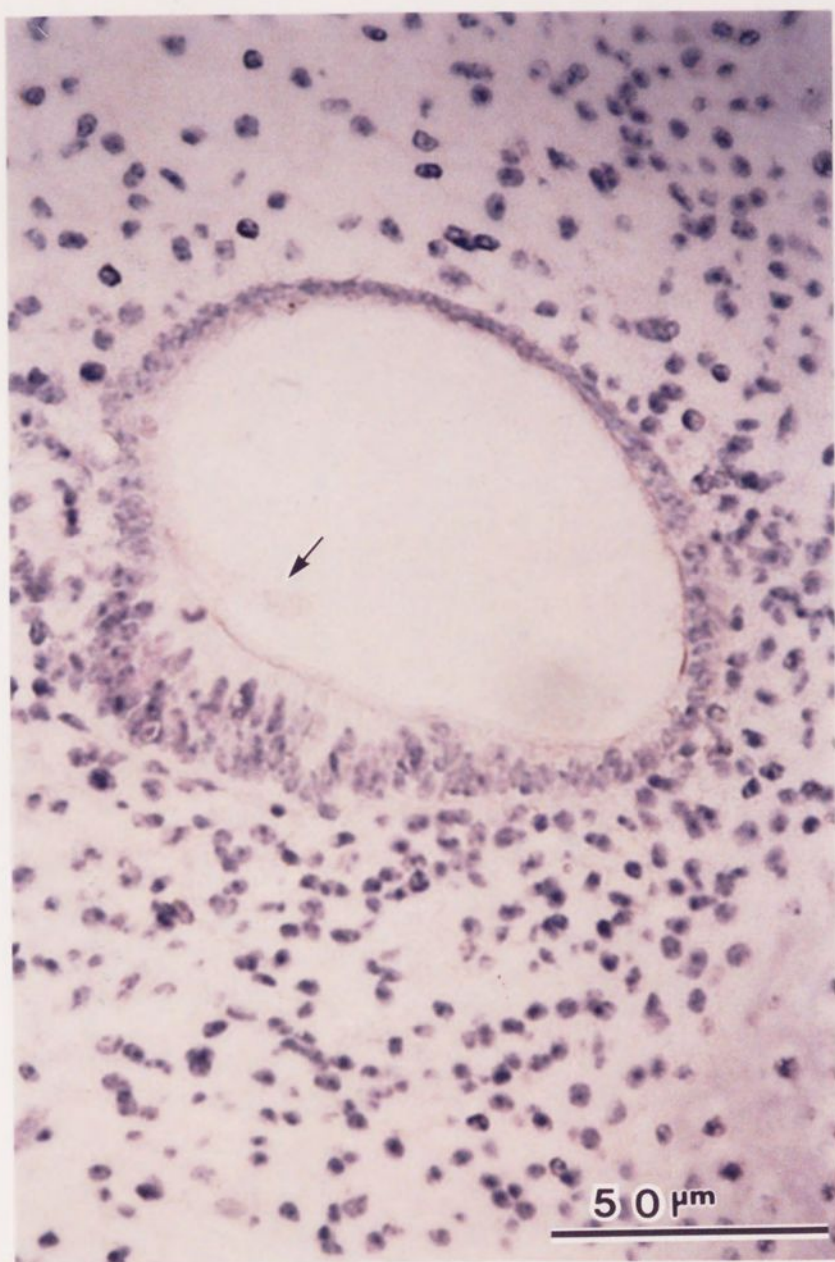
F i g . 1



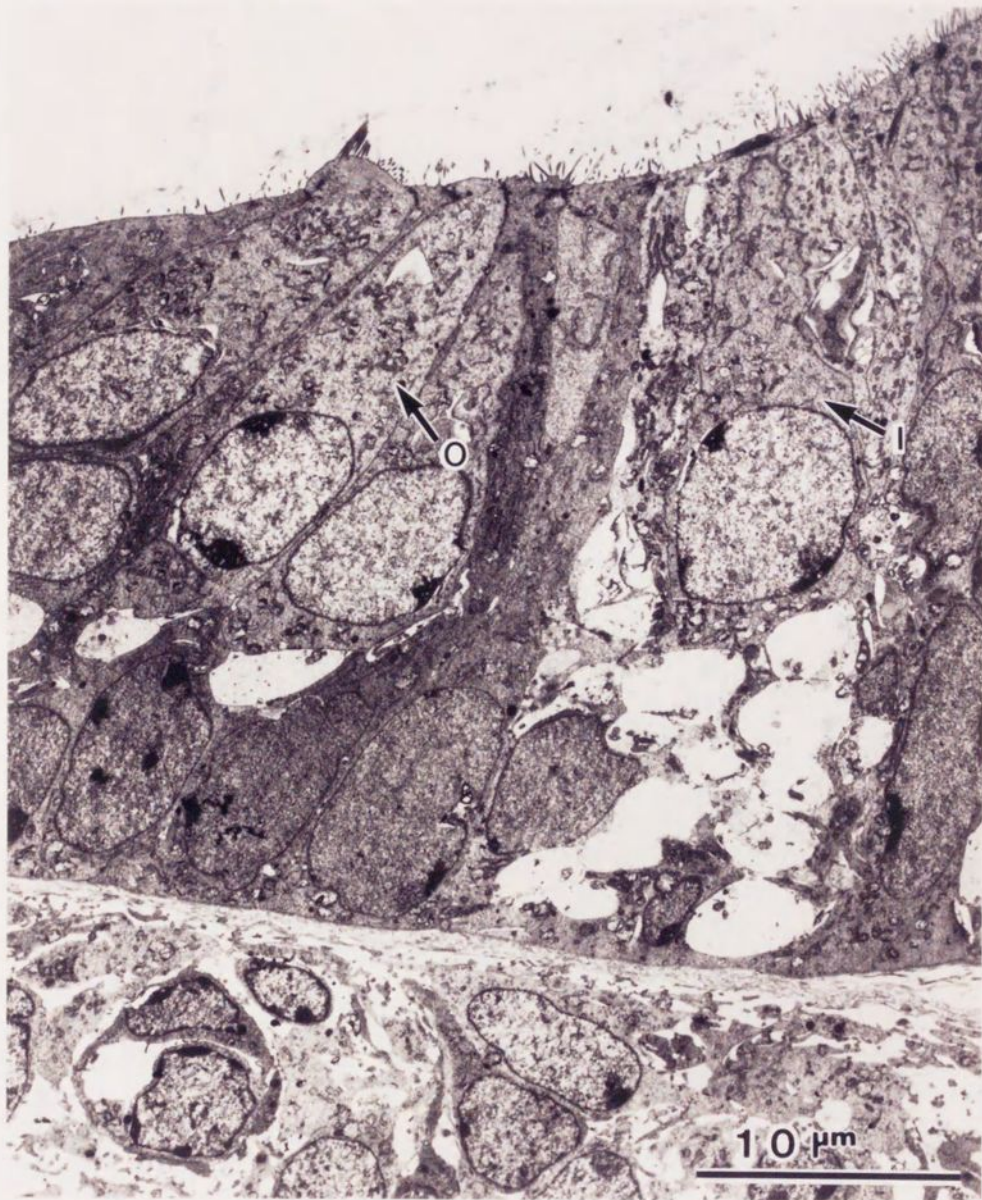
F i g . 2



F i g . 3



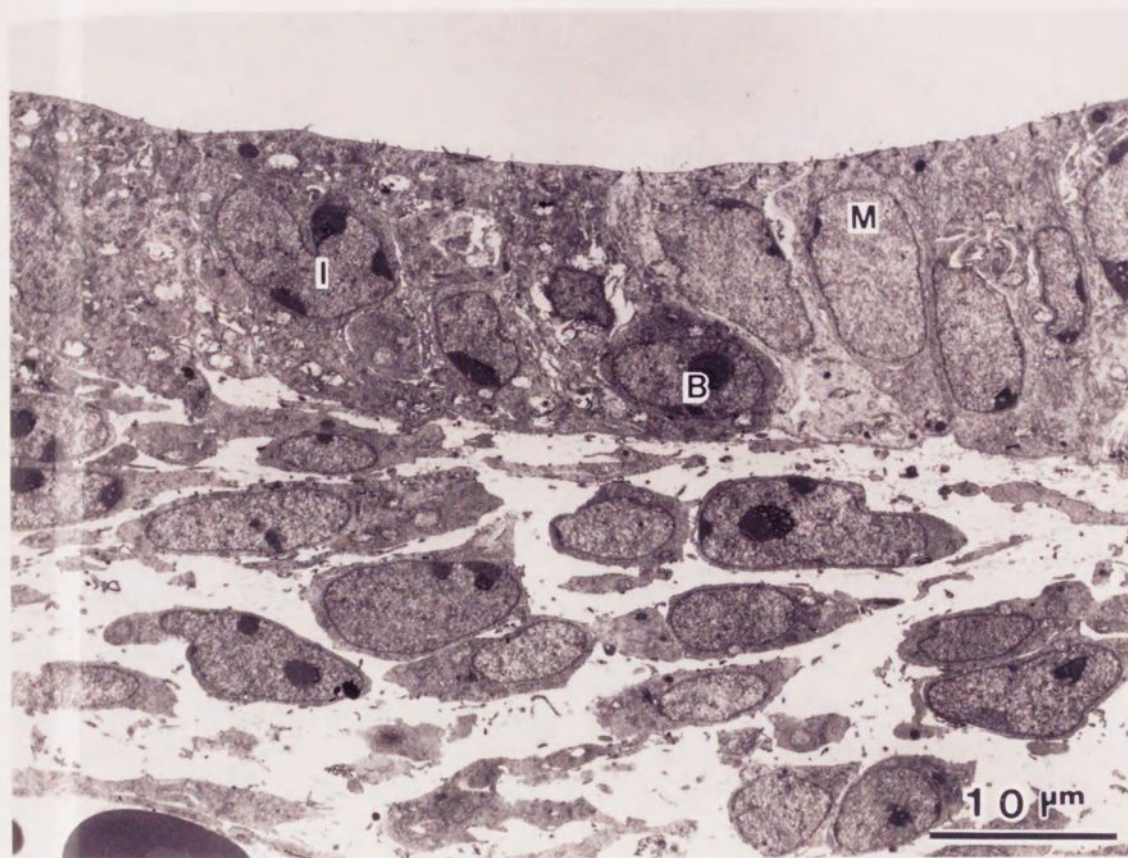
F i g . 4



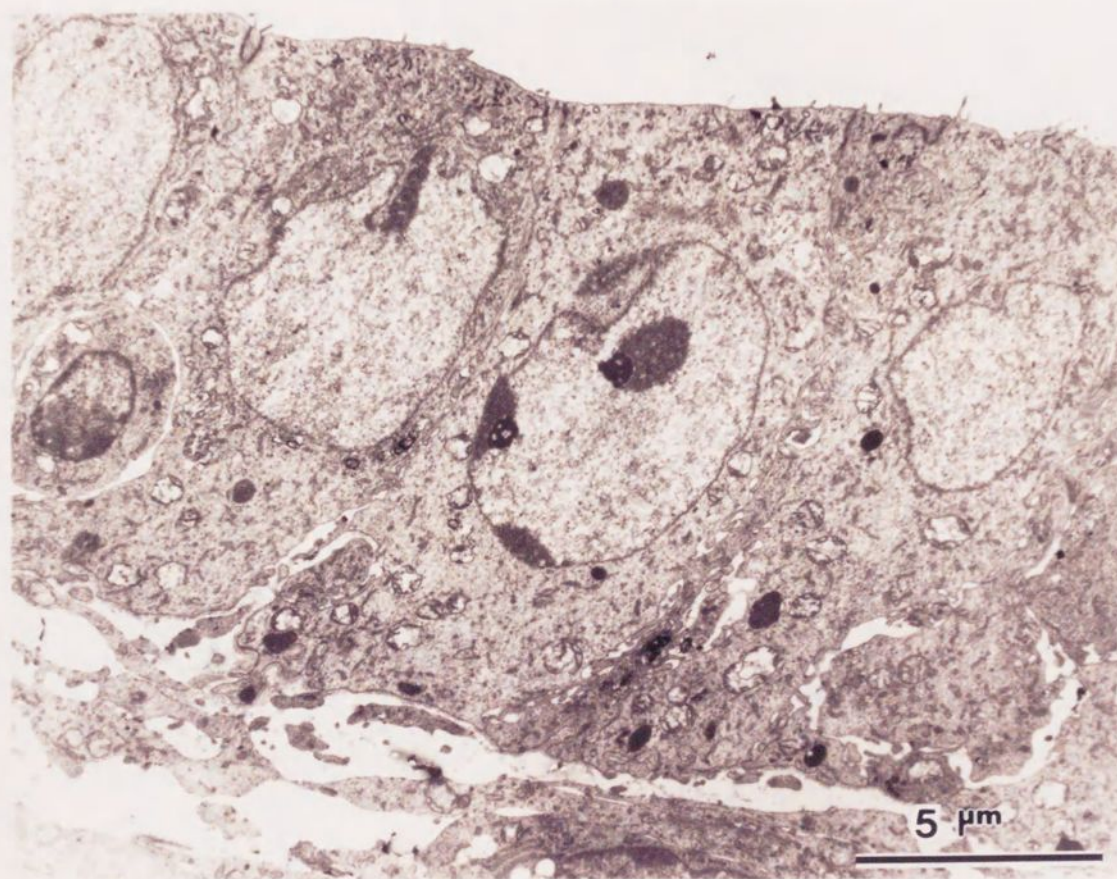
F i g . 5



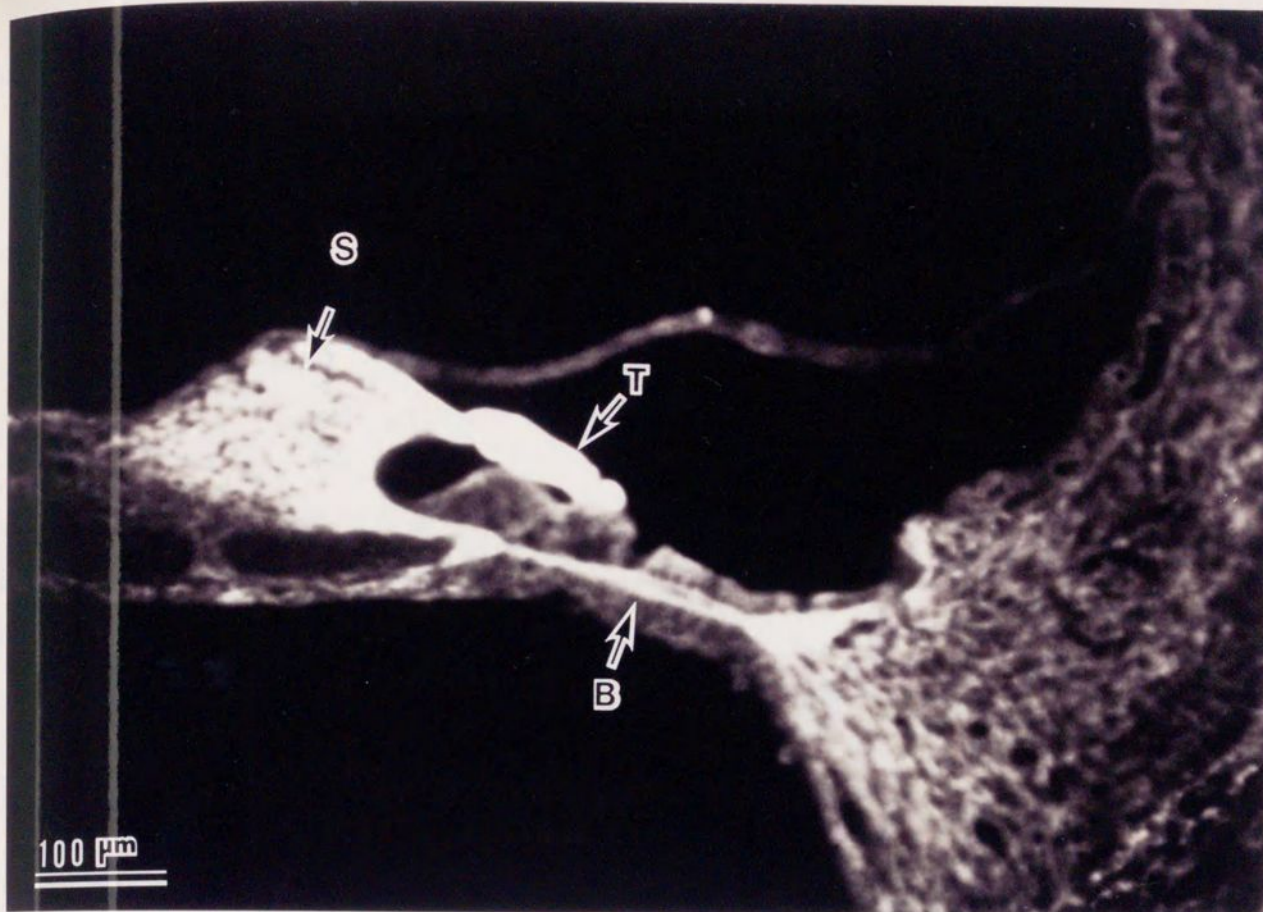
F i g . 6



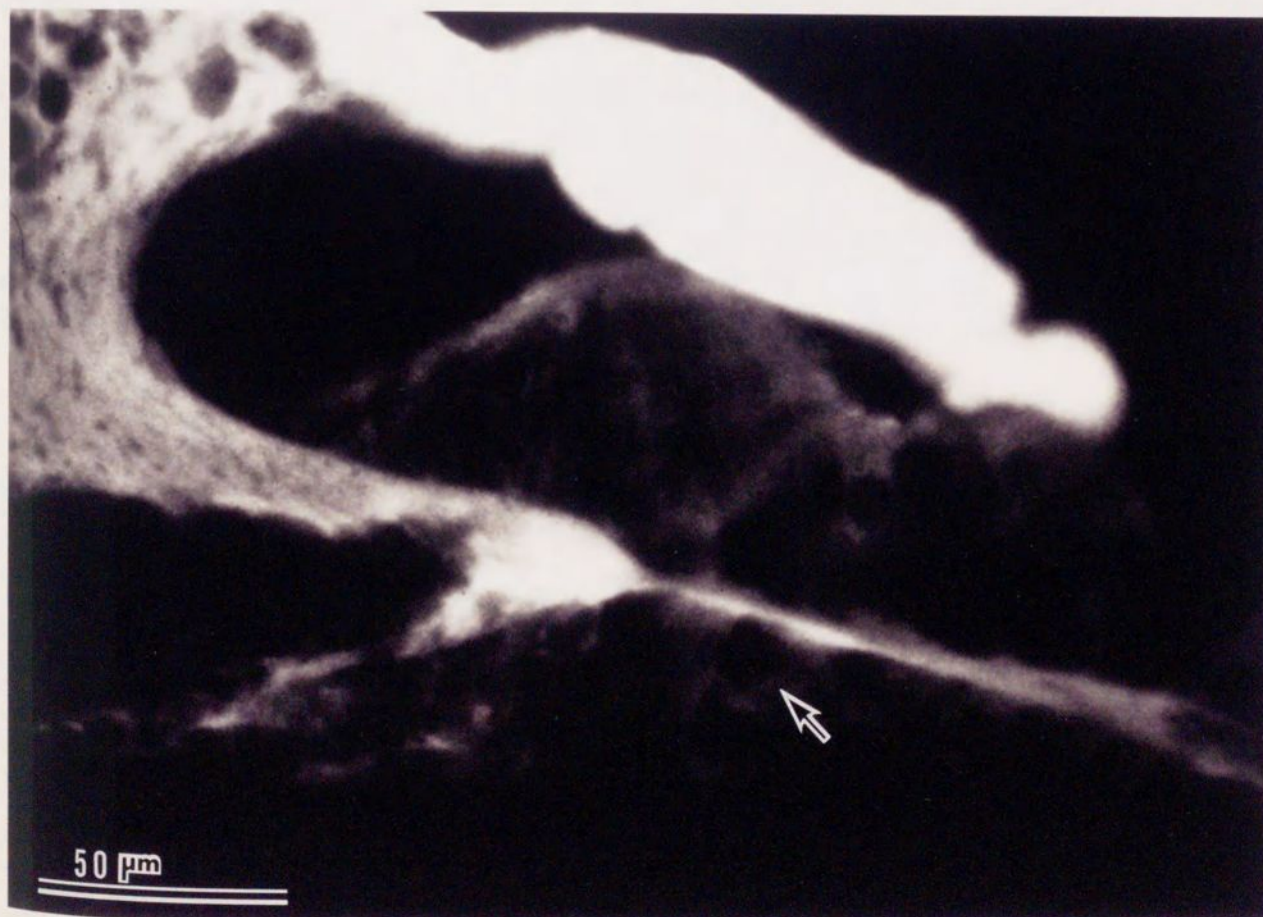
F i g . 7



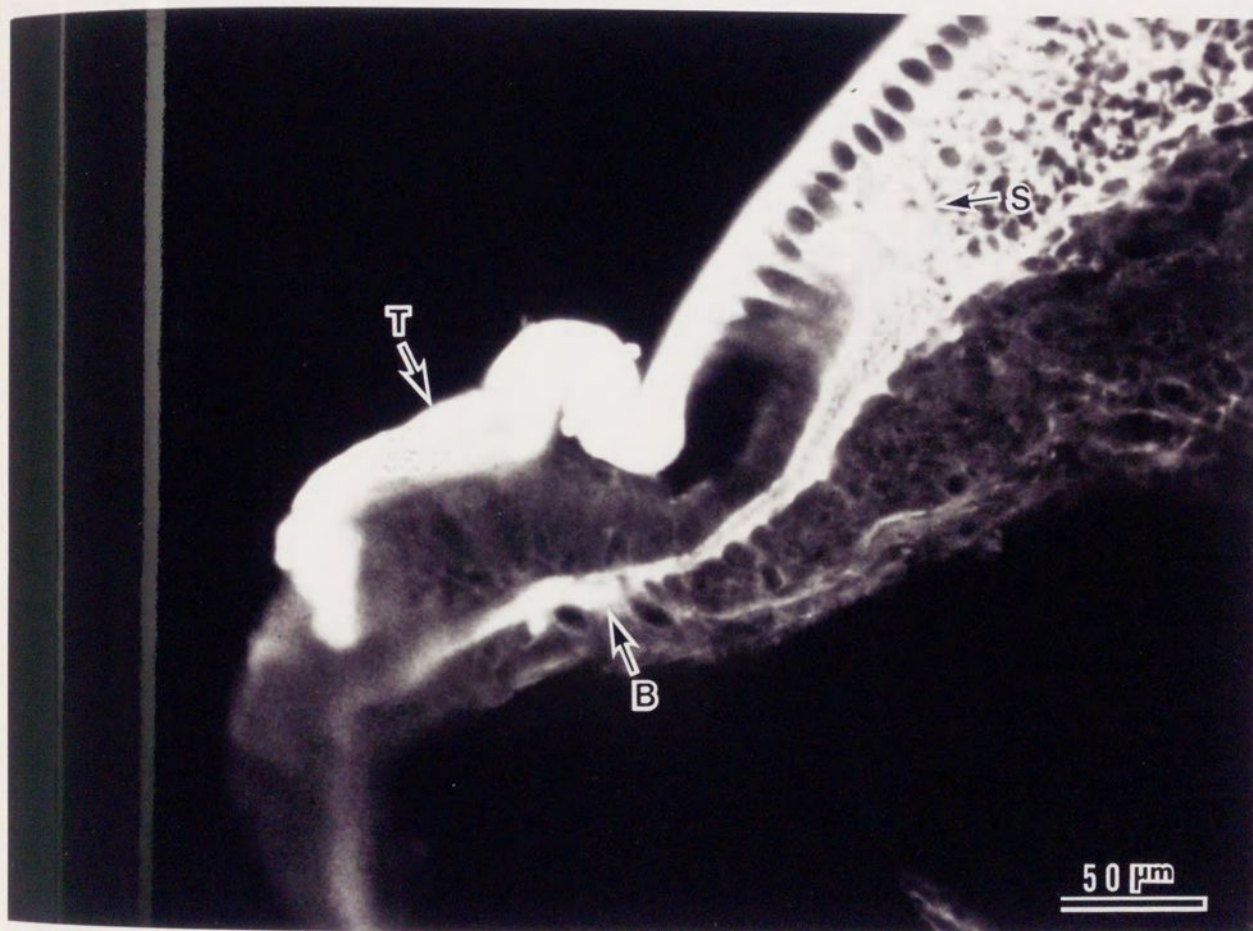
F i g . 8



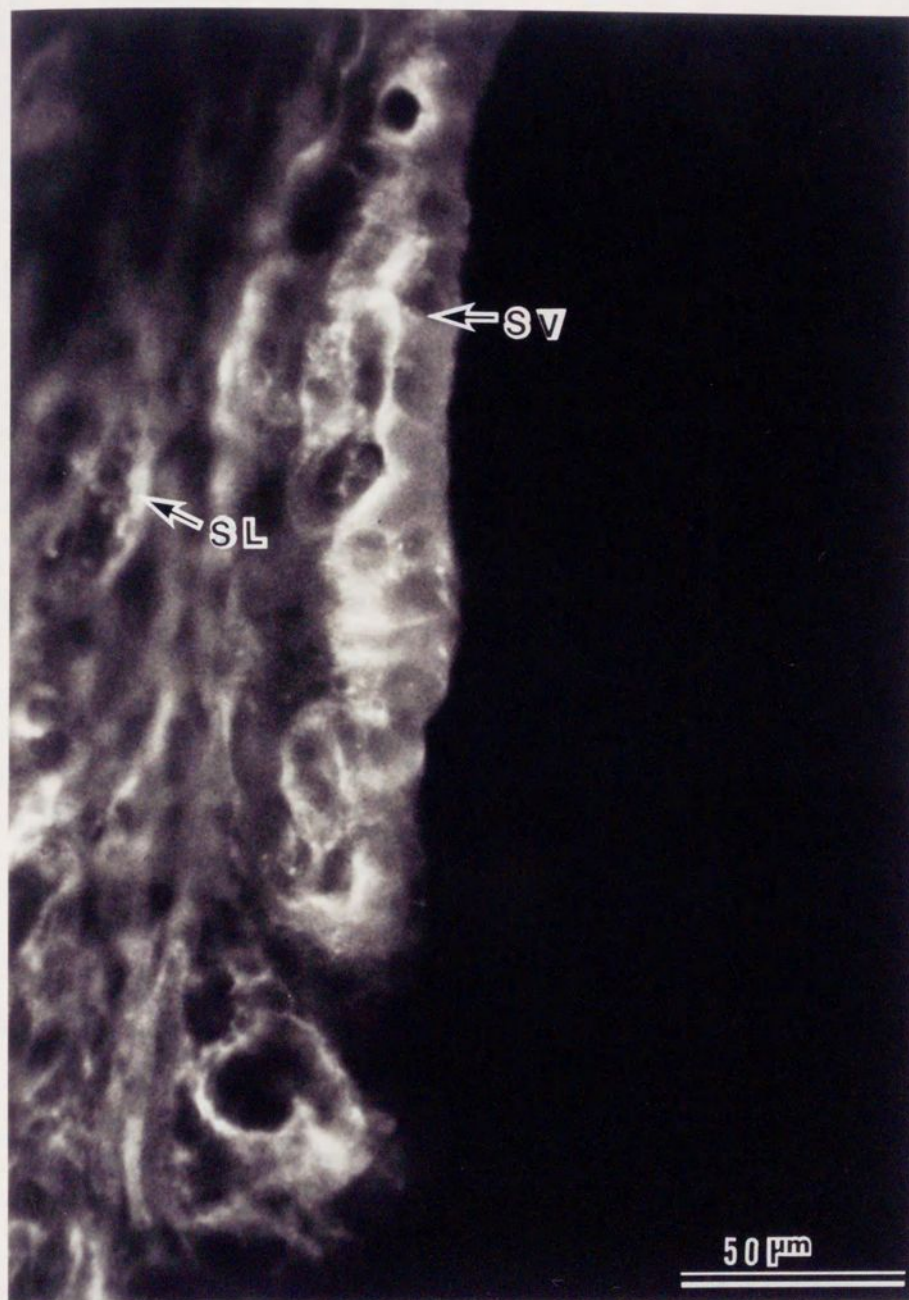
F i g . 9



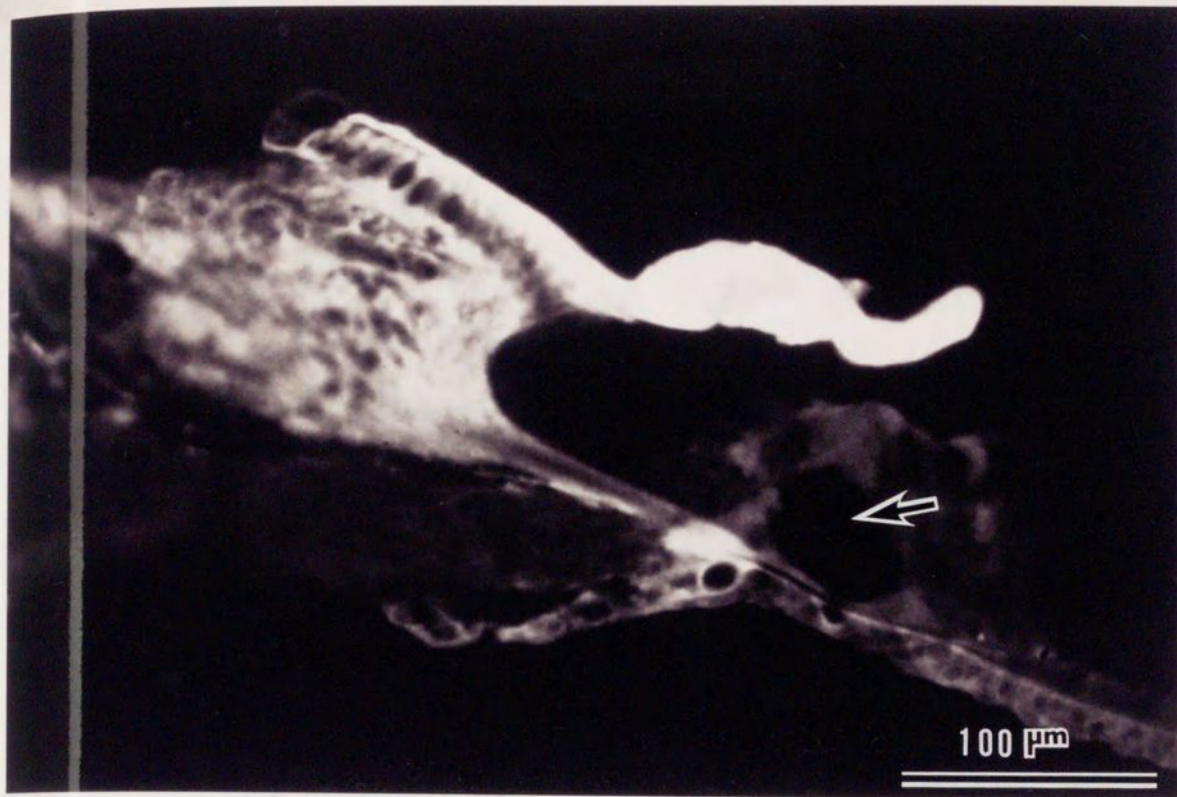
F i g . 1 0



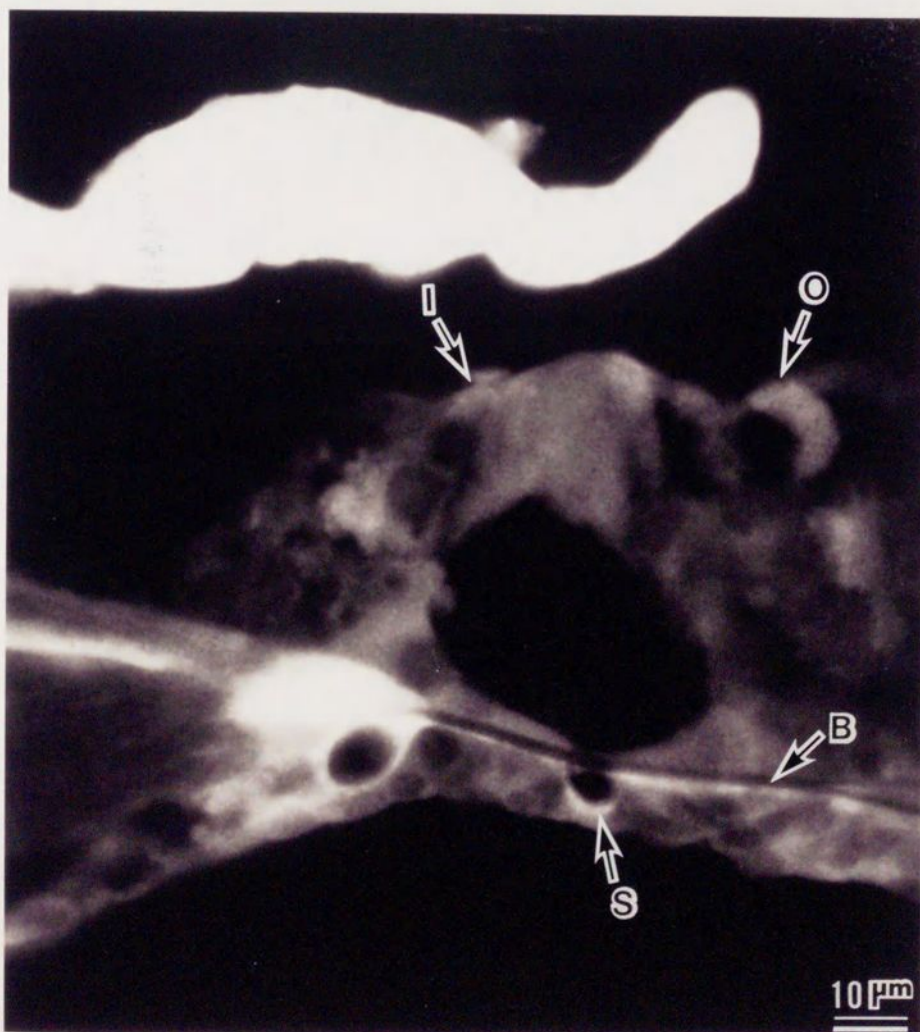
F i g . 1 1



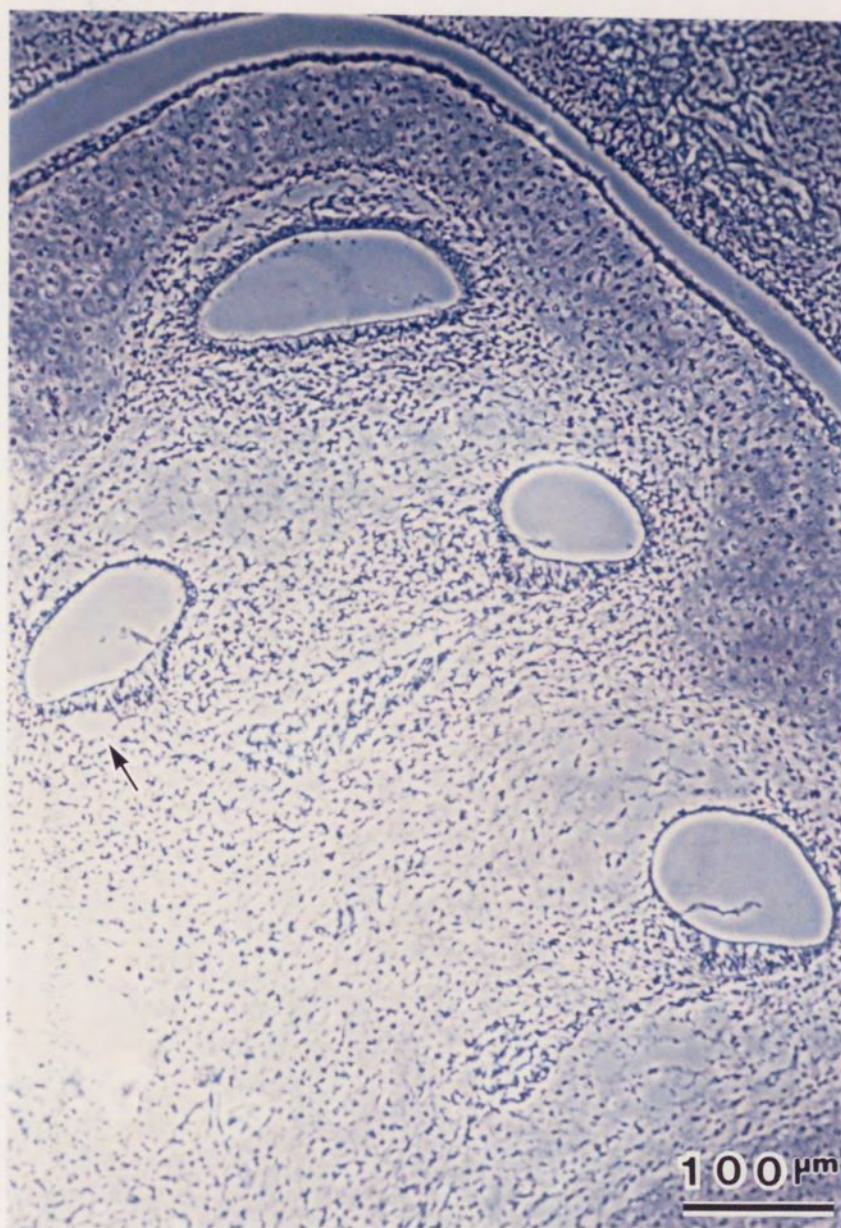
F i g . 1 2



F i g . 1 3



F i g . 1 4



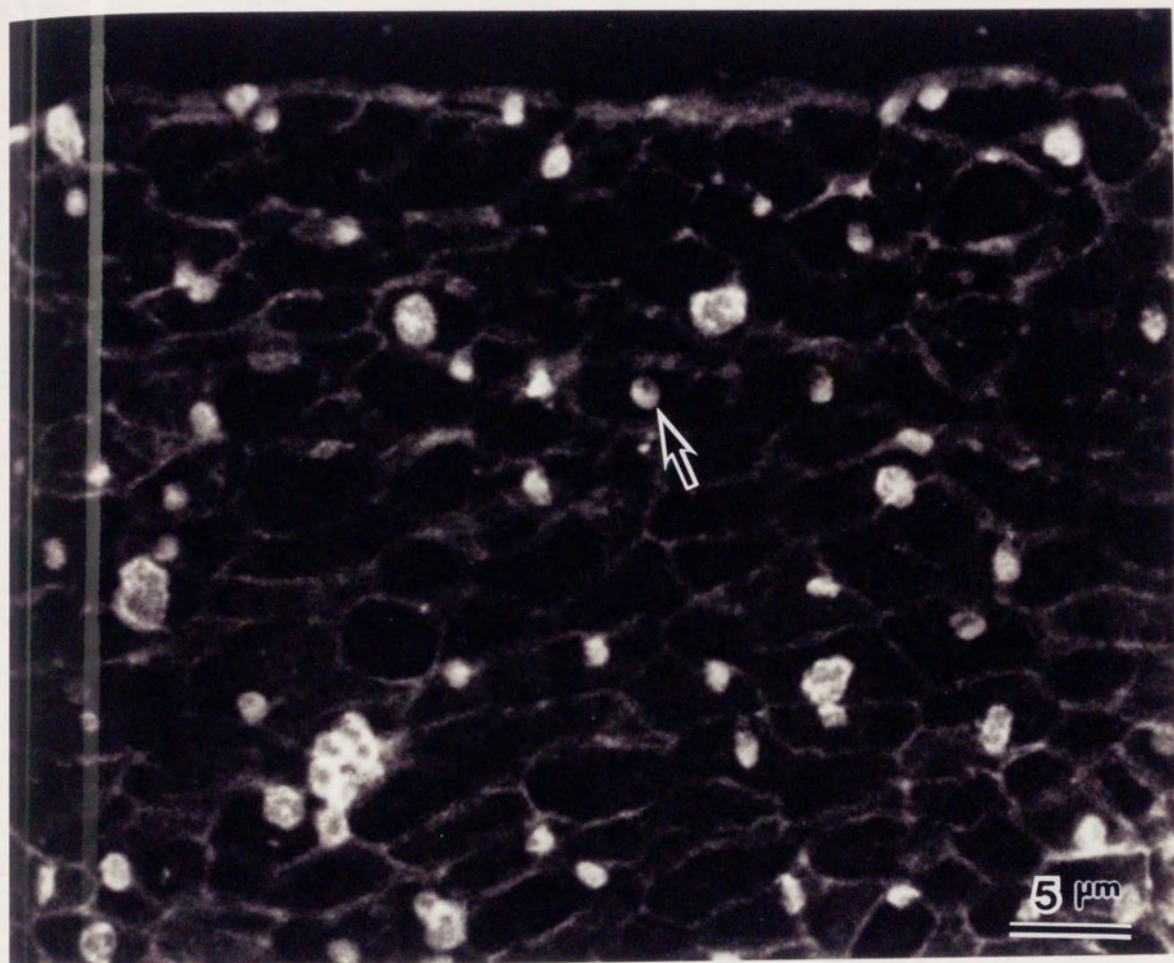
F i g . 1 5



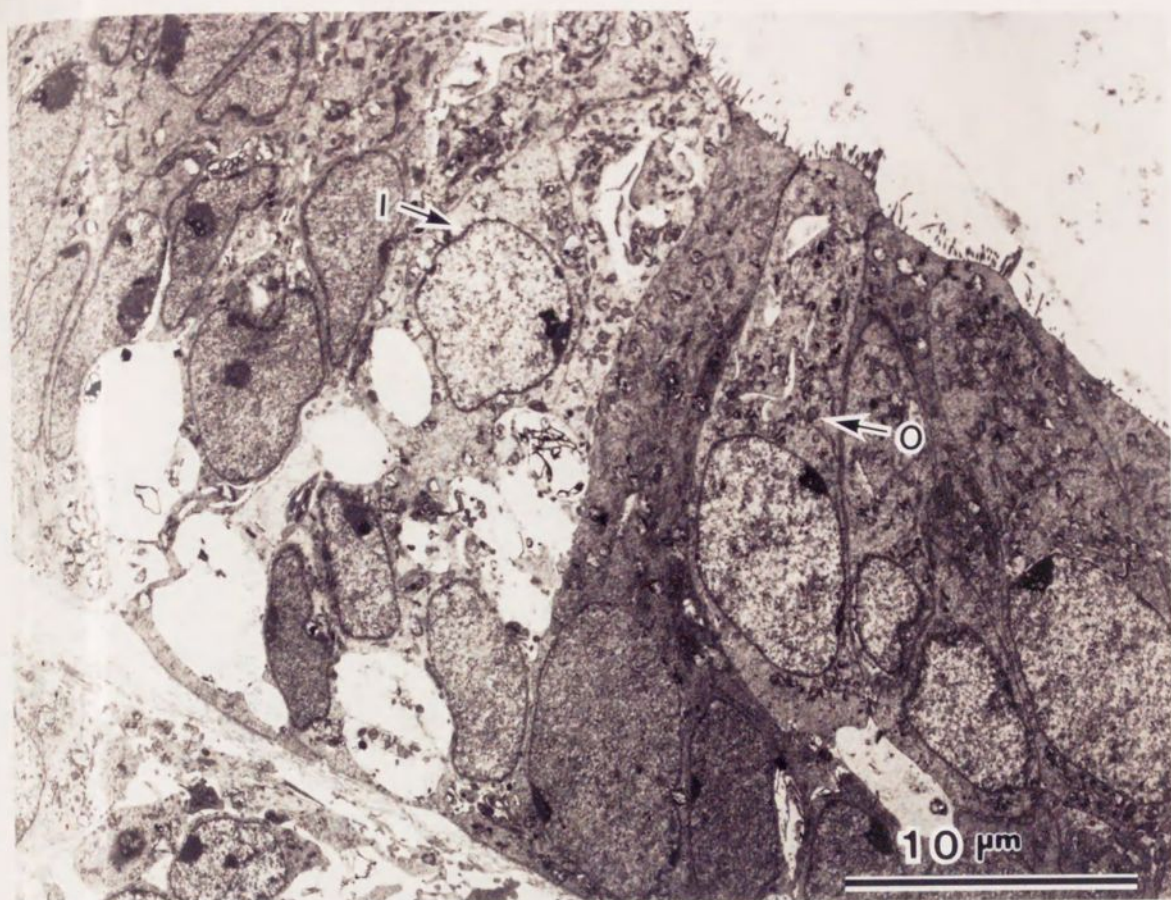
F i g . 1 6



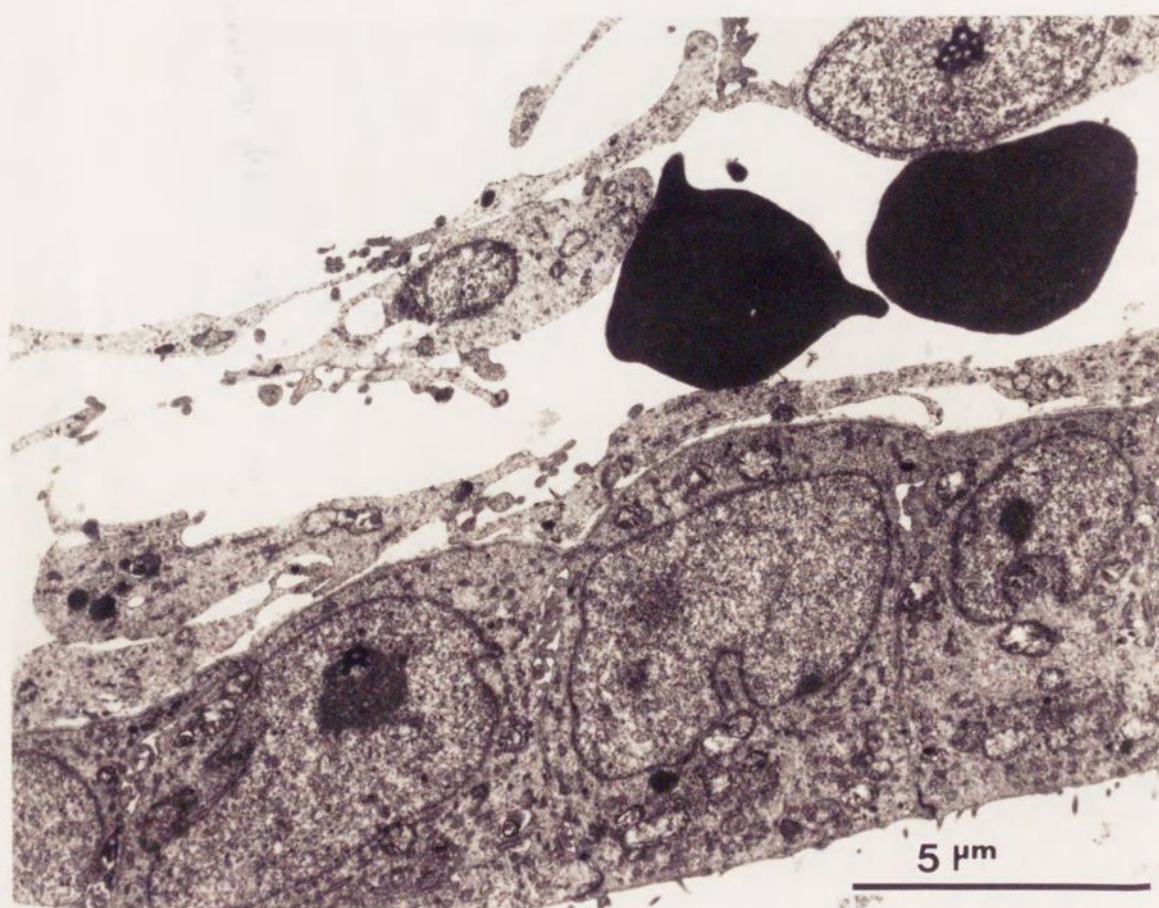
F i g . 1 7



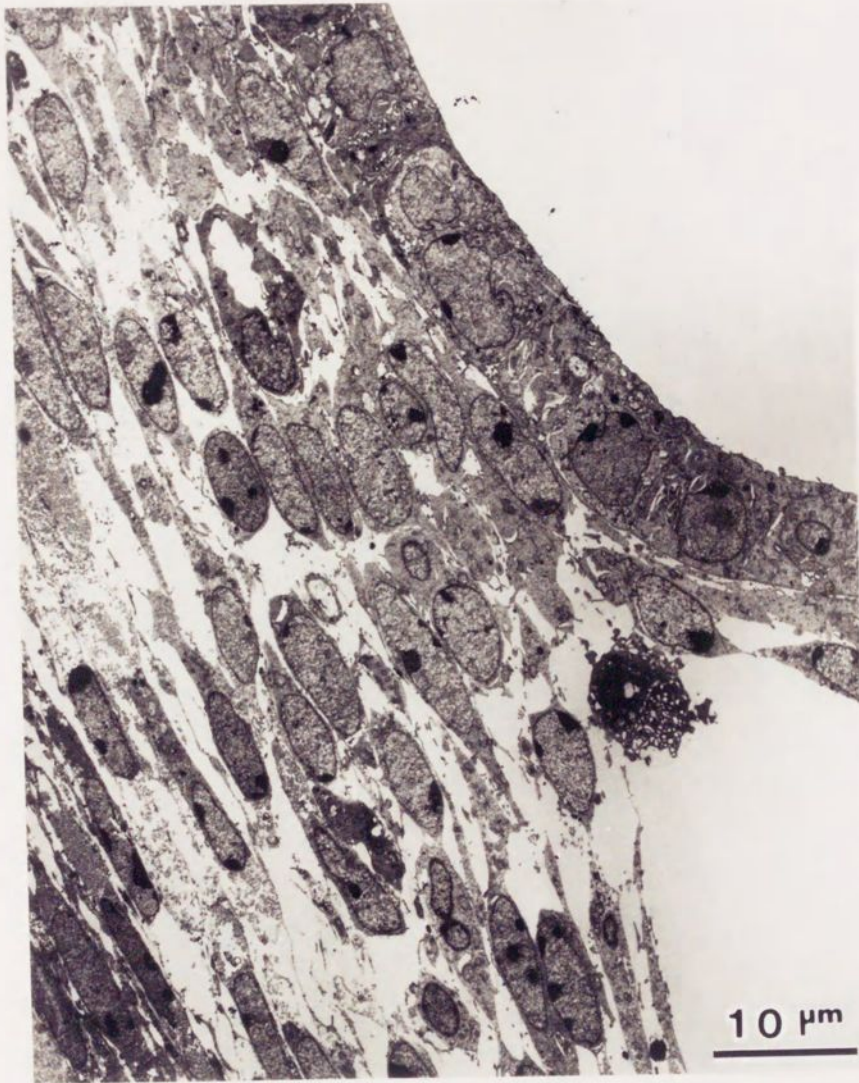
F i g . 1 8



F i g . 1 9



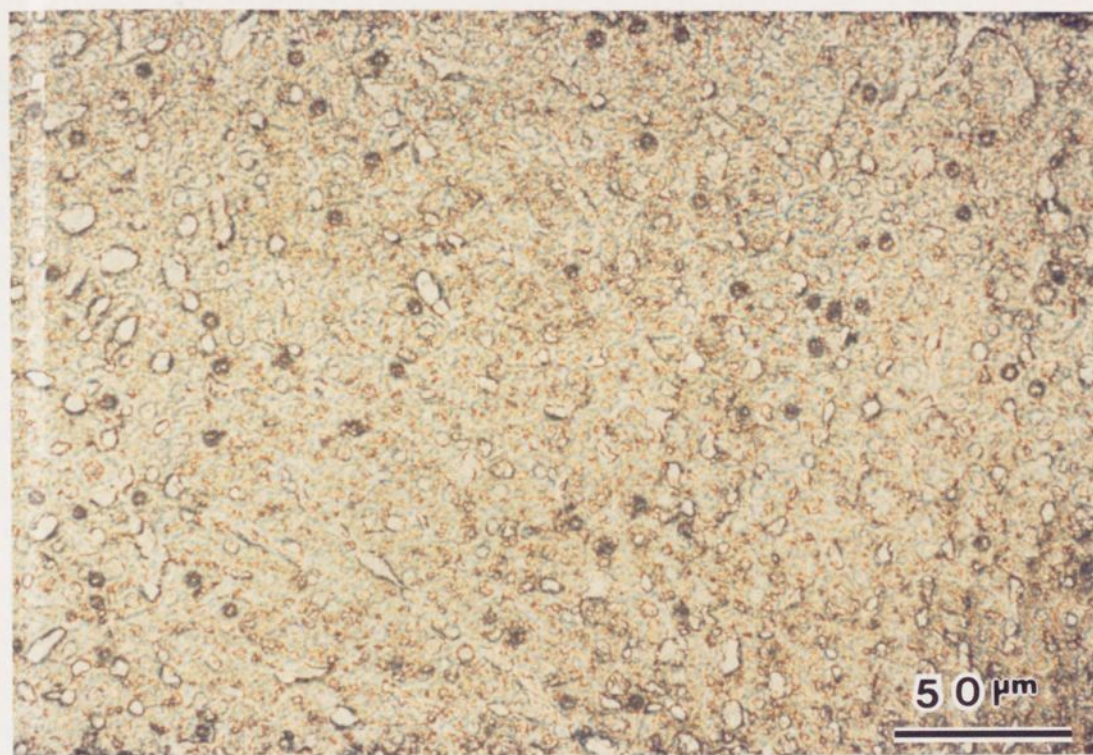
F i g . 2 0



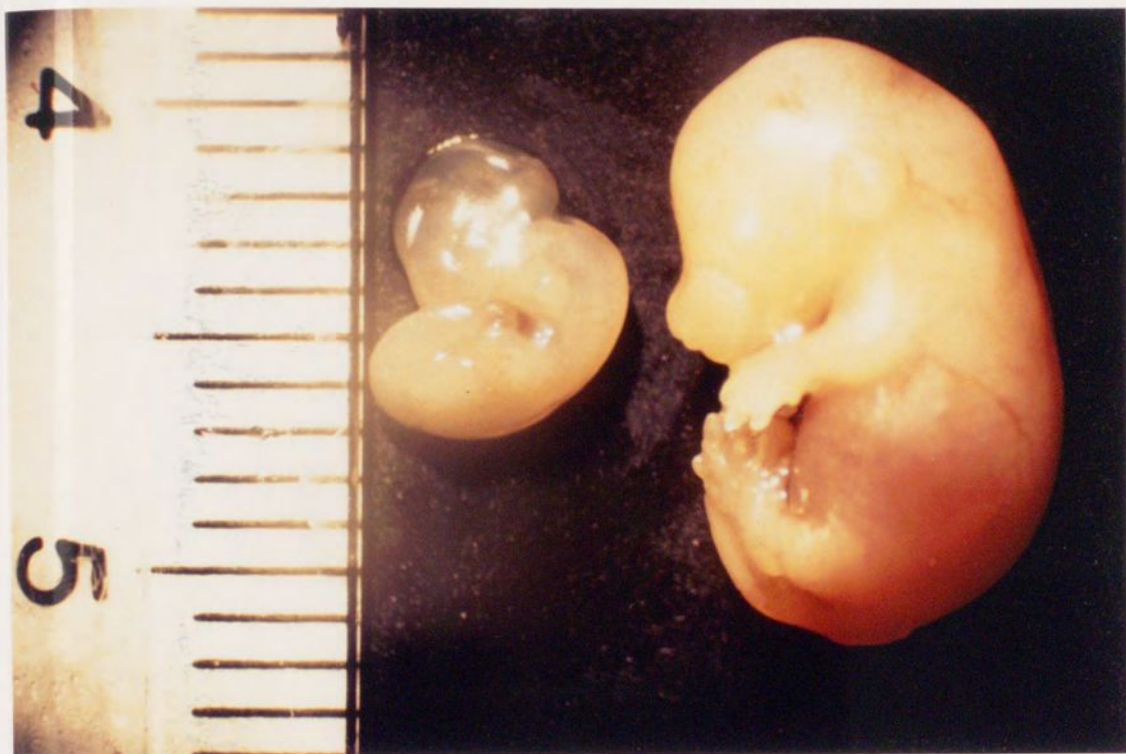
F i g . 2 1



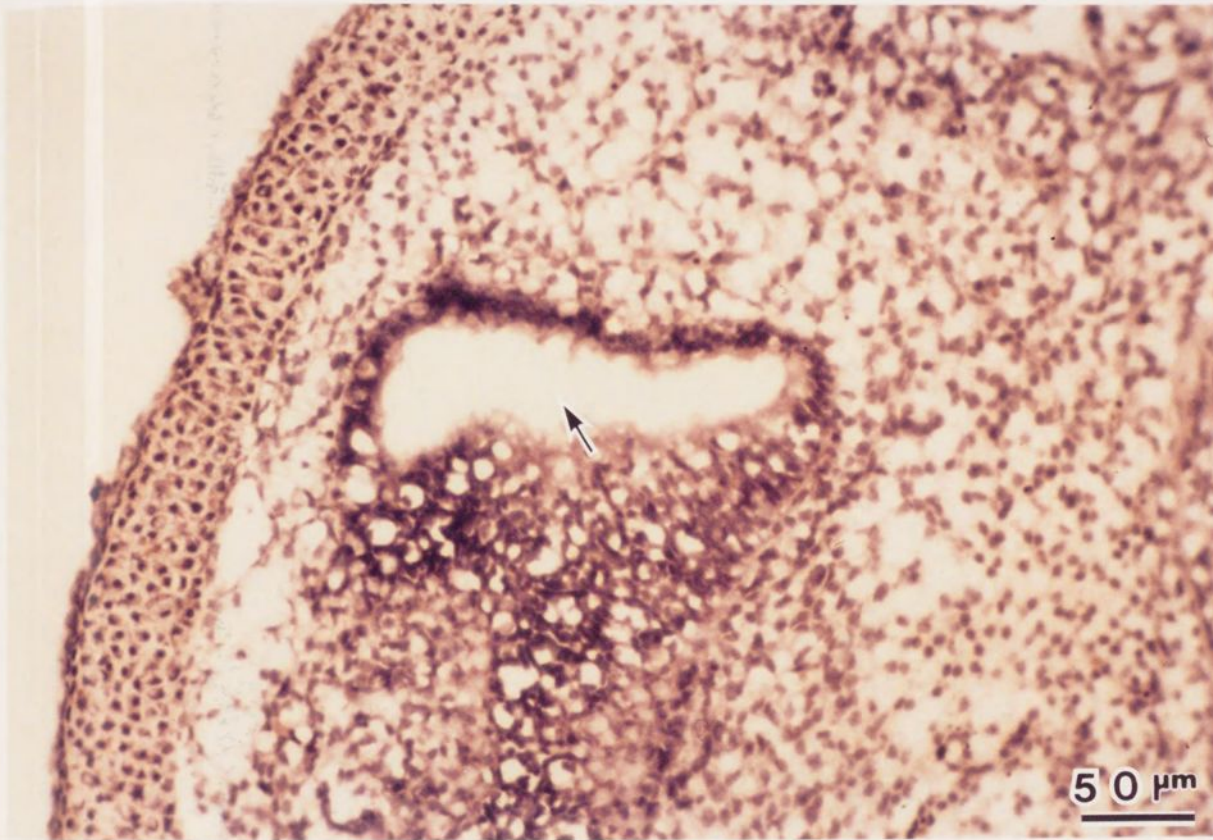
F i g . 2 2



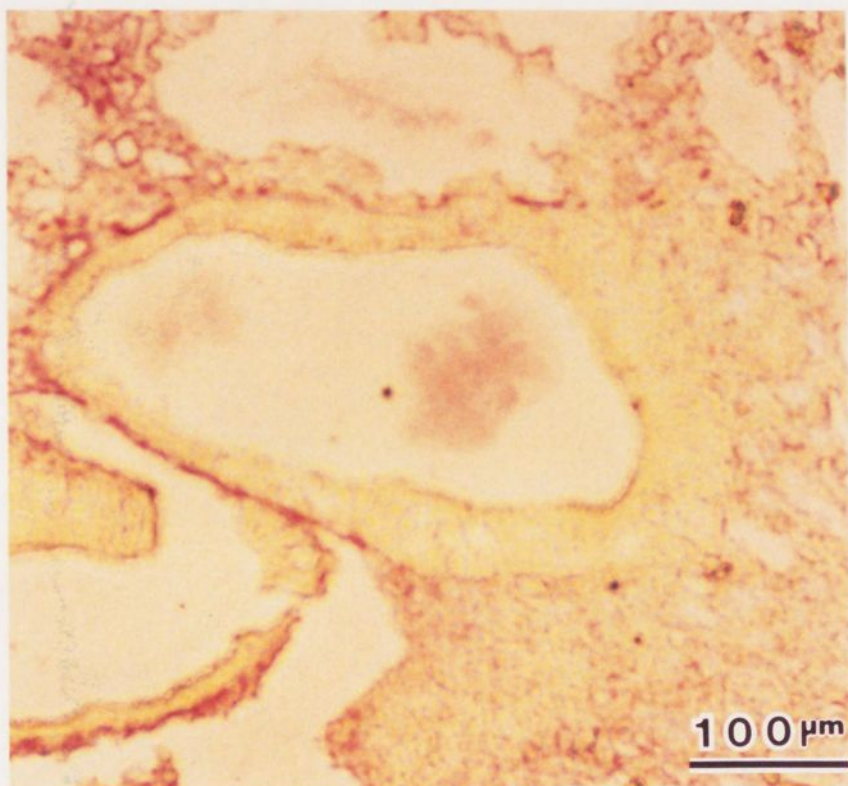
F i g . 2 3



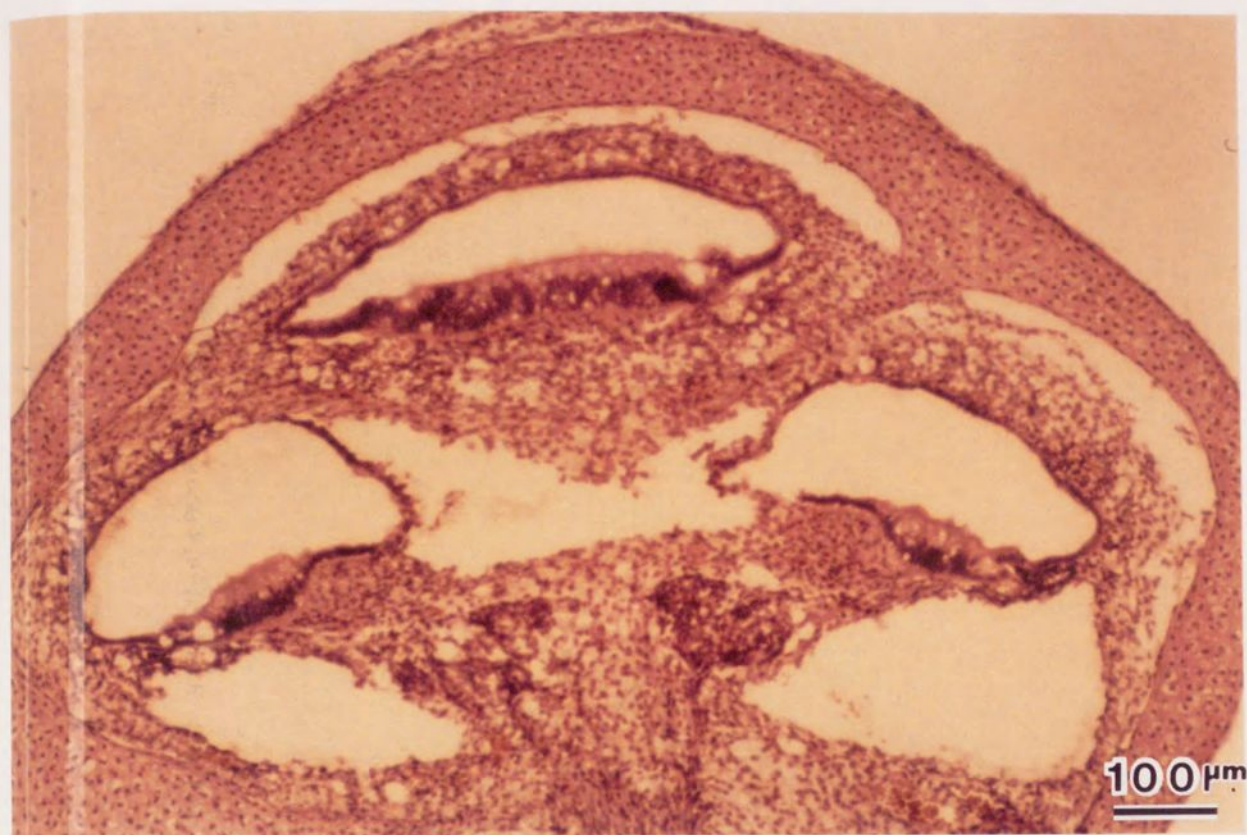
F i g . 2 4



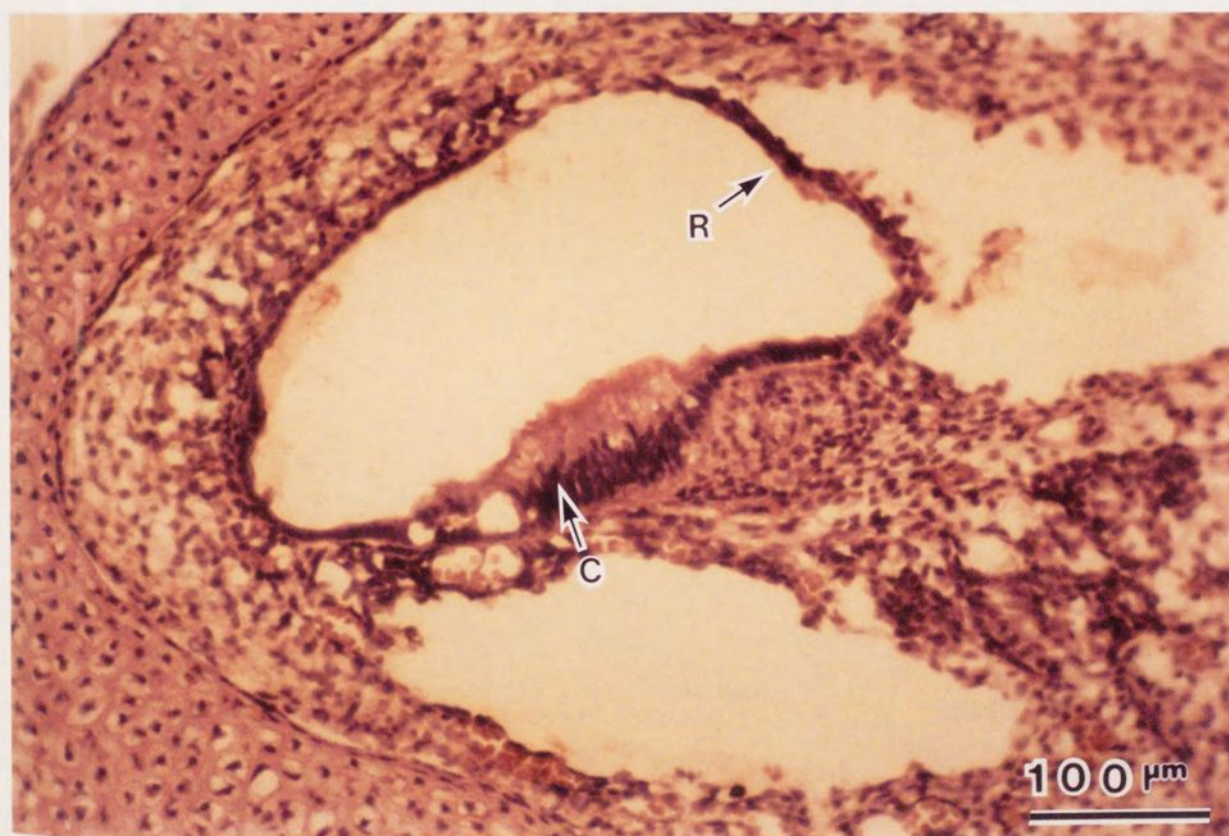
F i g . 2 5



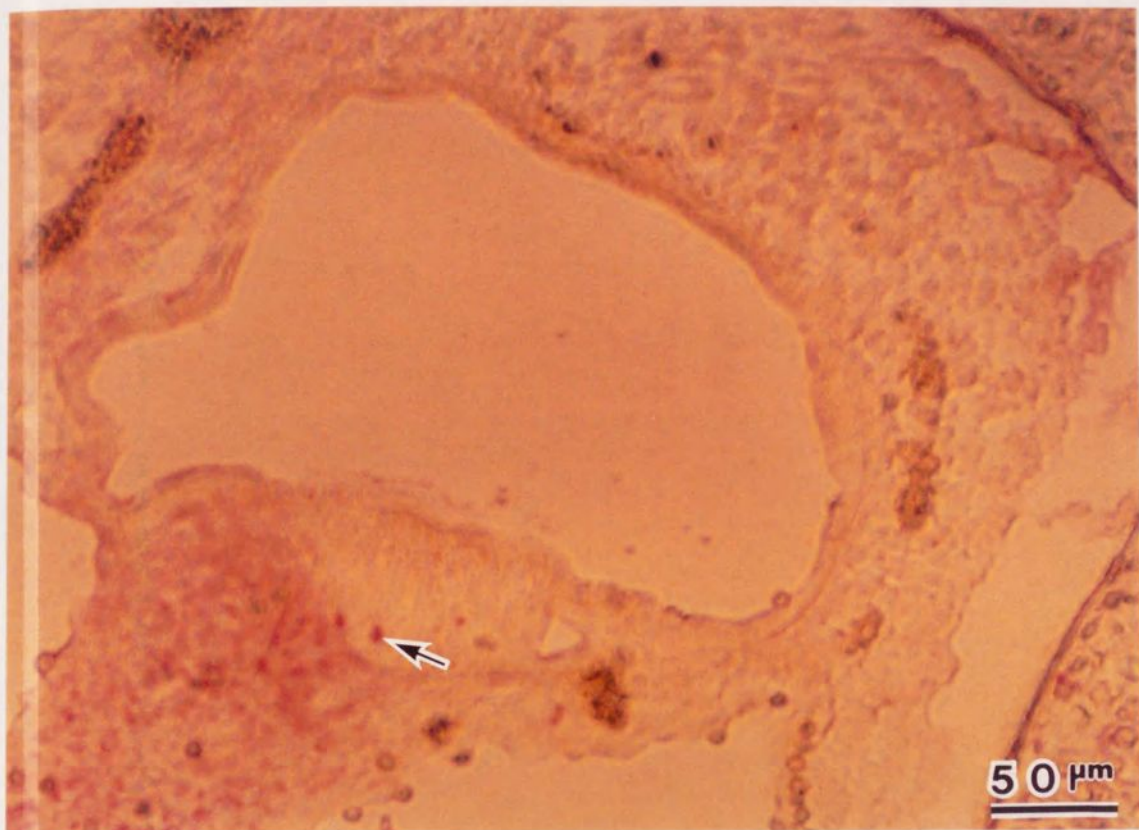
F i g . 2 6



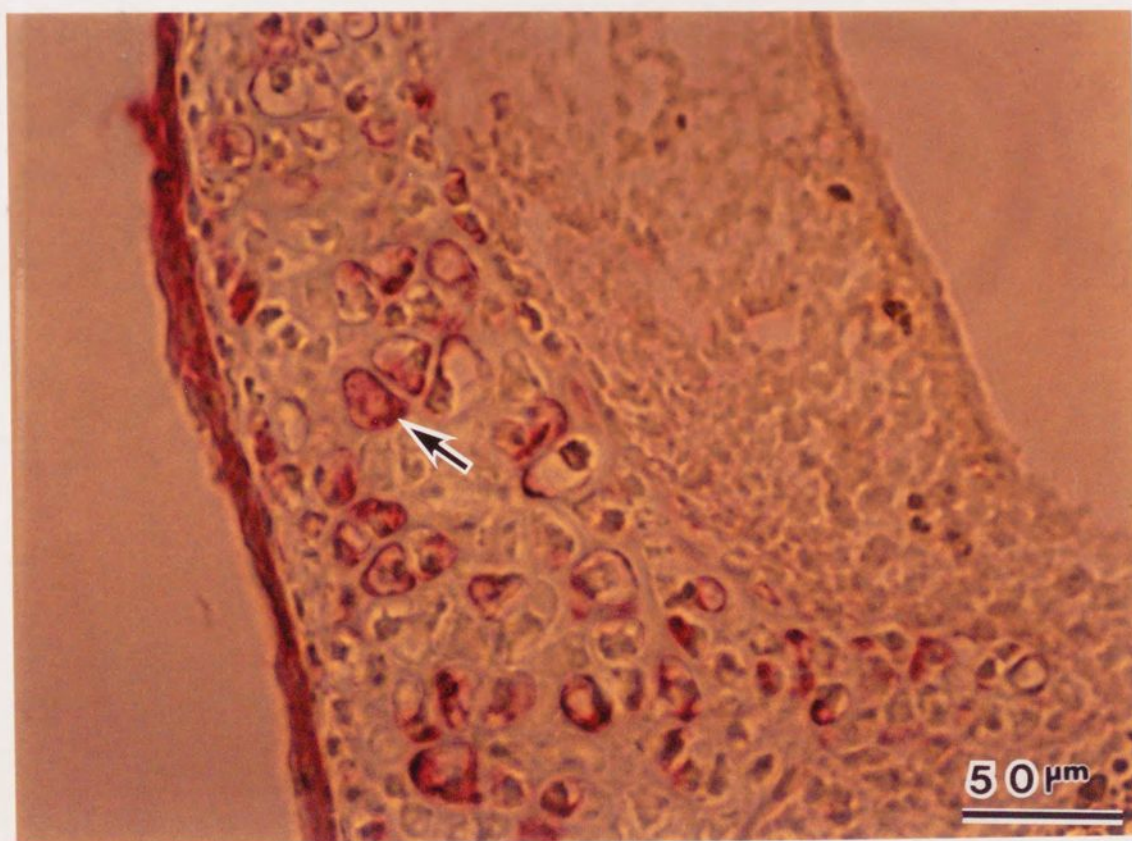
F i g . 2 7



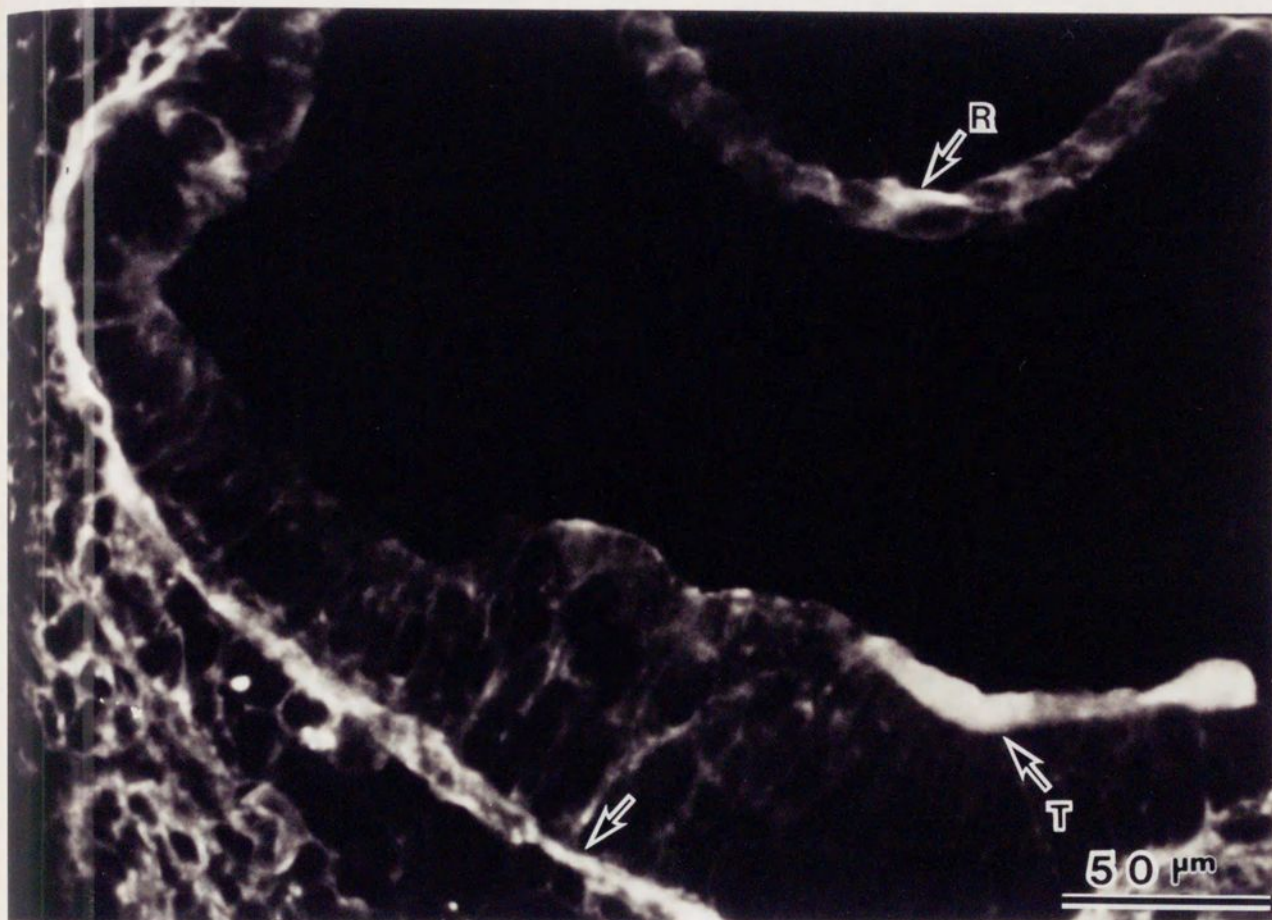
F i g . 2 8



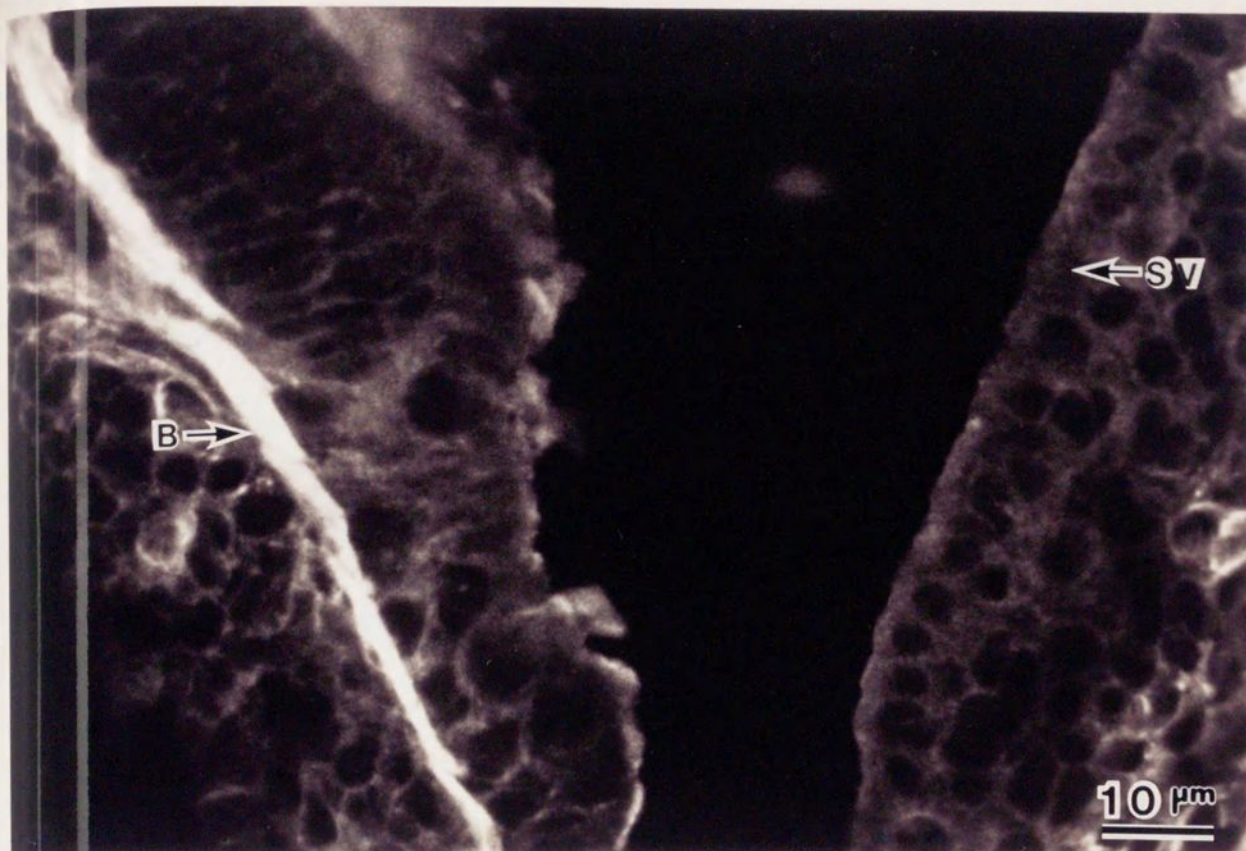
F i g . 2 9



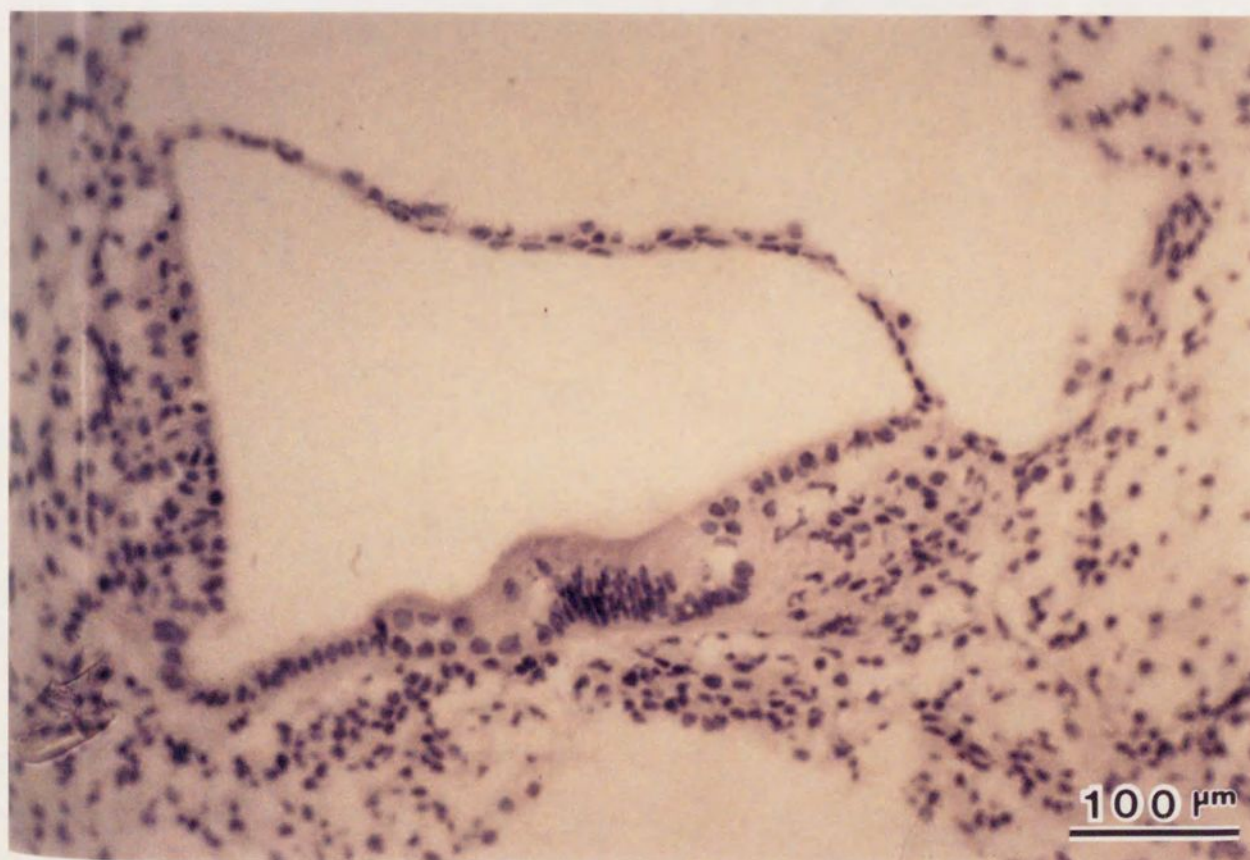
F i g . 3 0



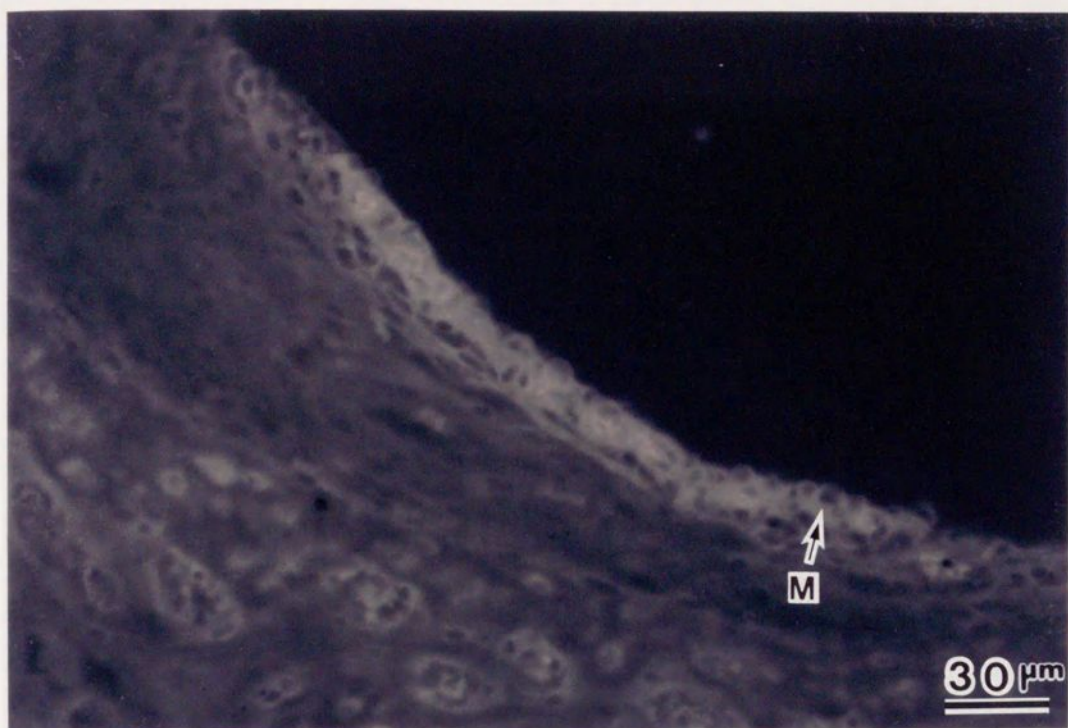
F i g . 3 1



F i g . 3 2



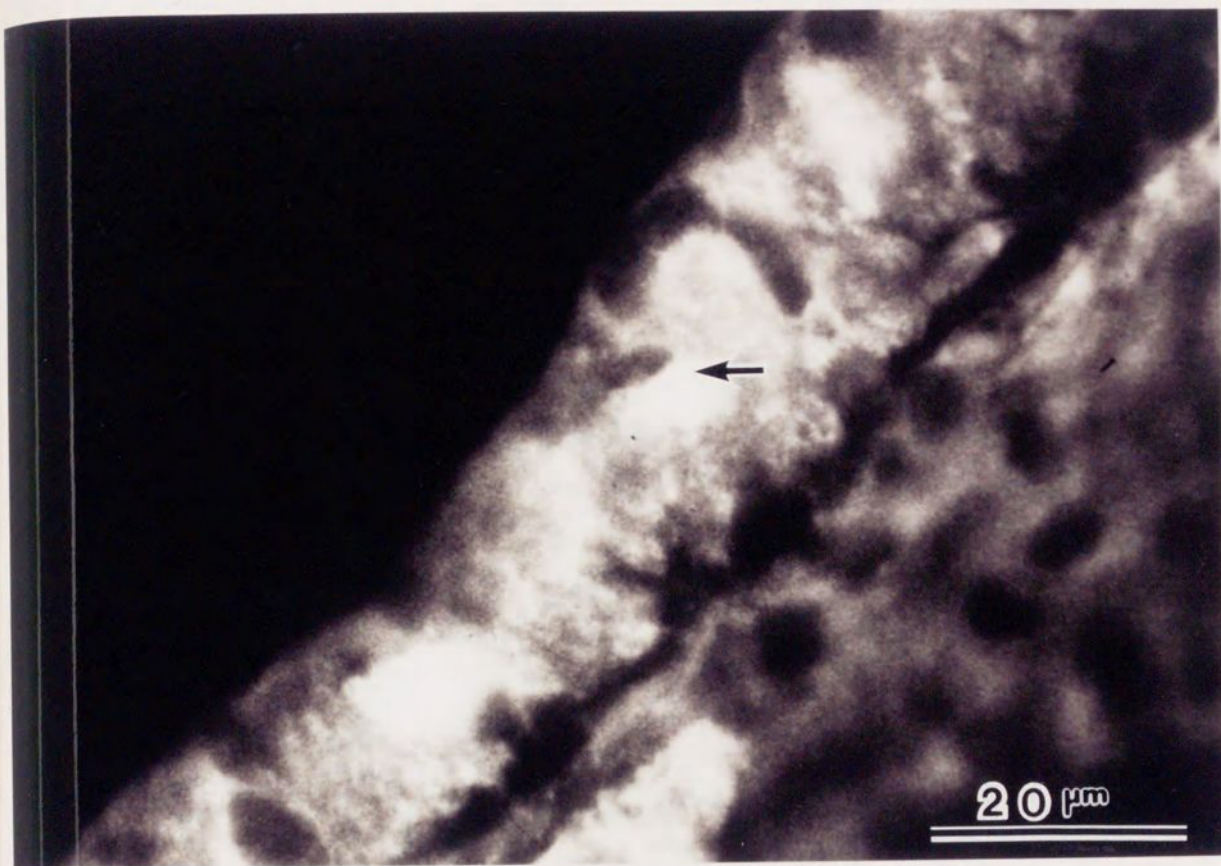
F i g . 3 3



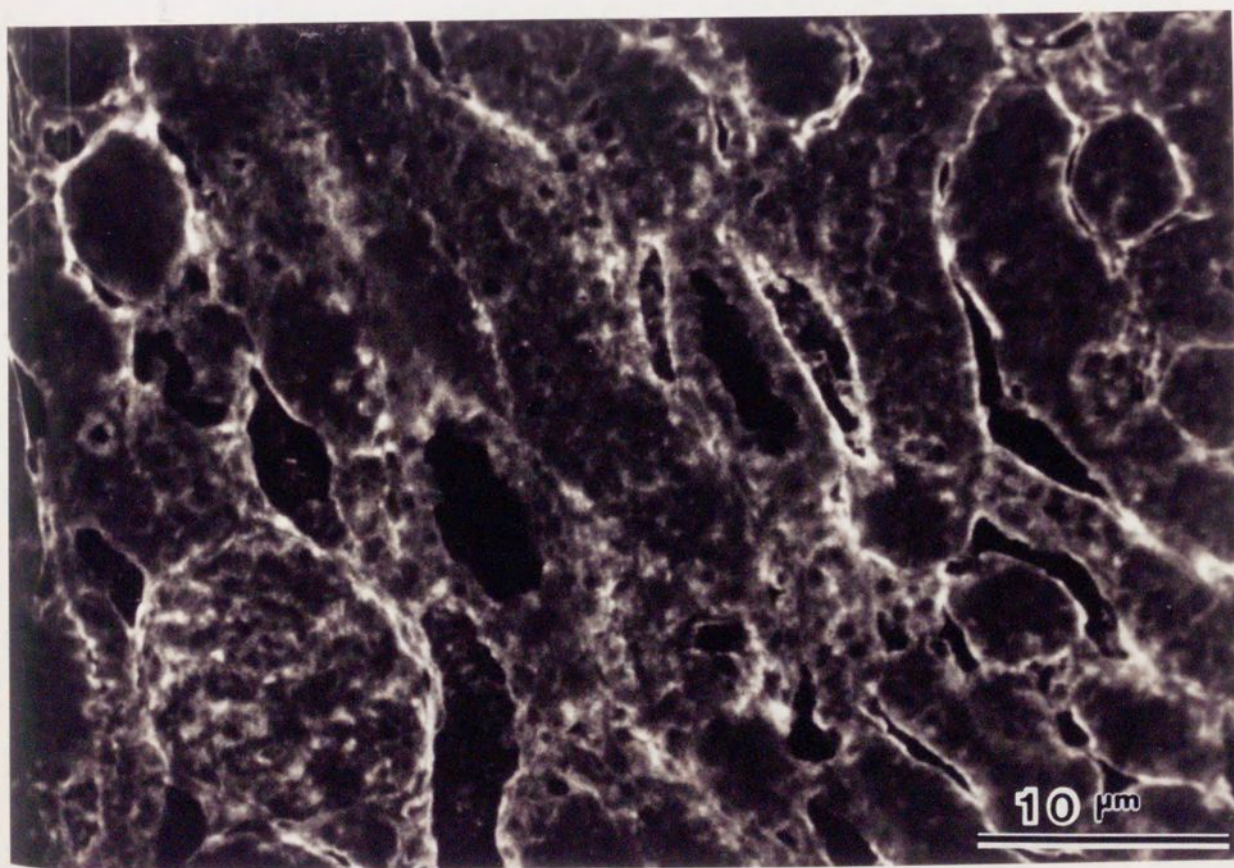
F i g . 3 4



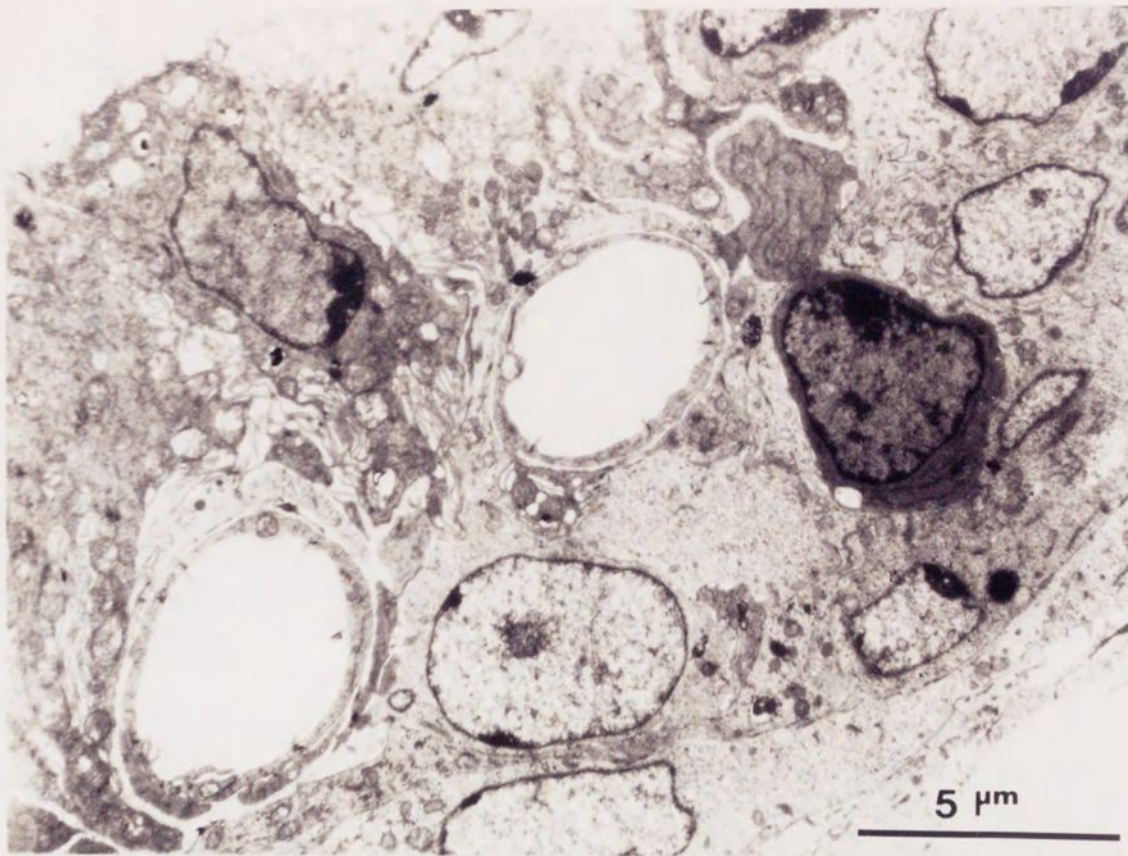
F i g . 3 5



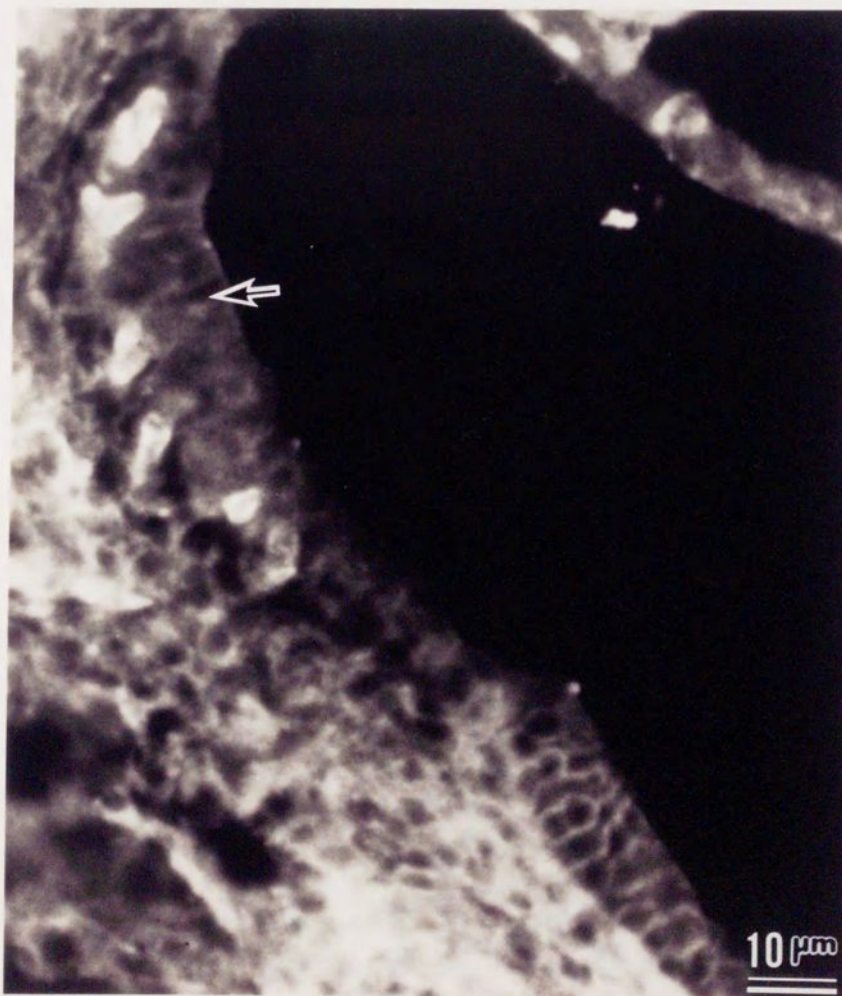
F i g . 3 6



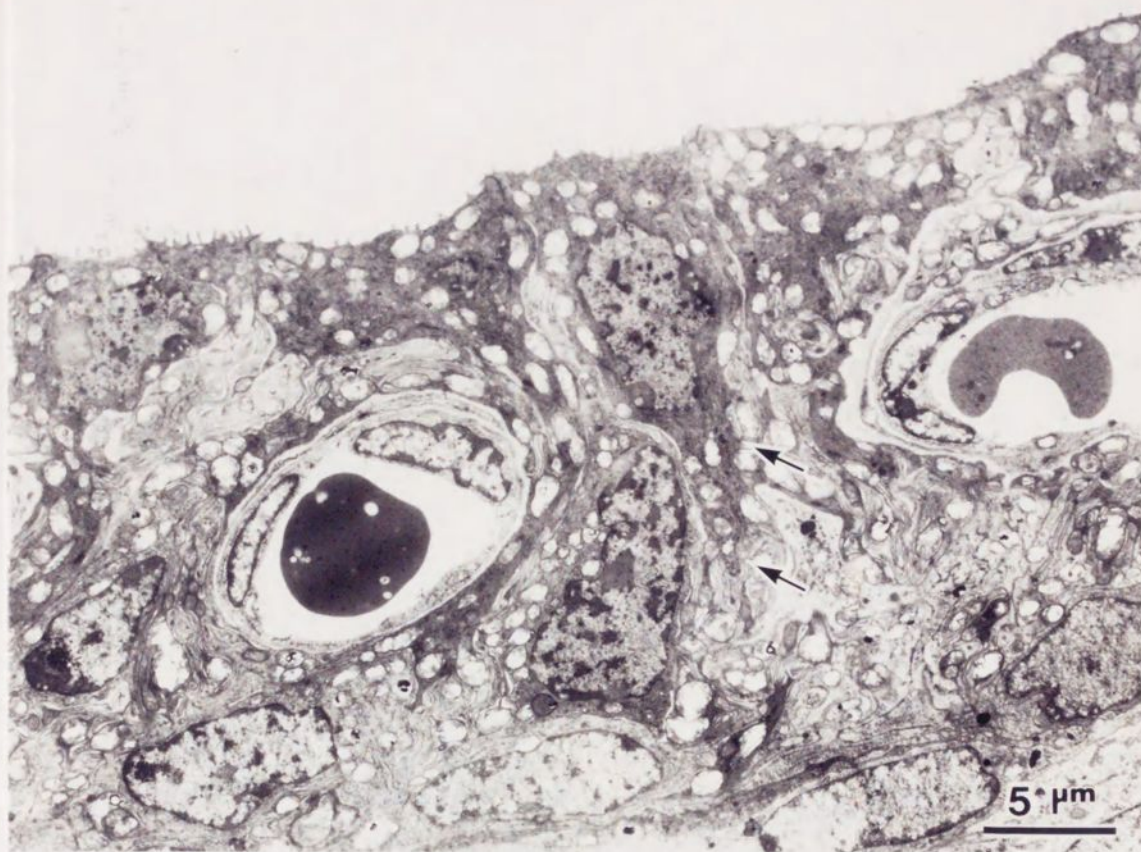
F i g . 3 7



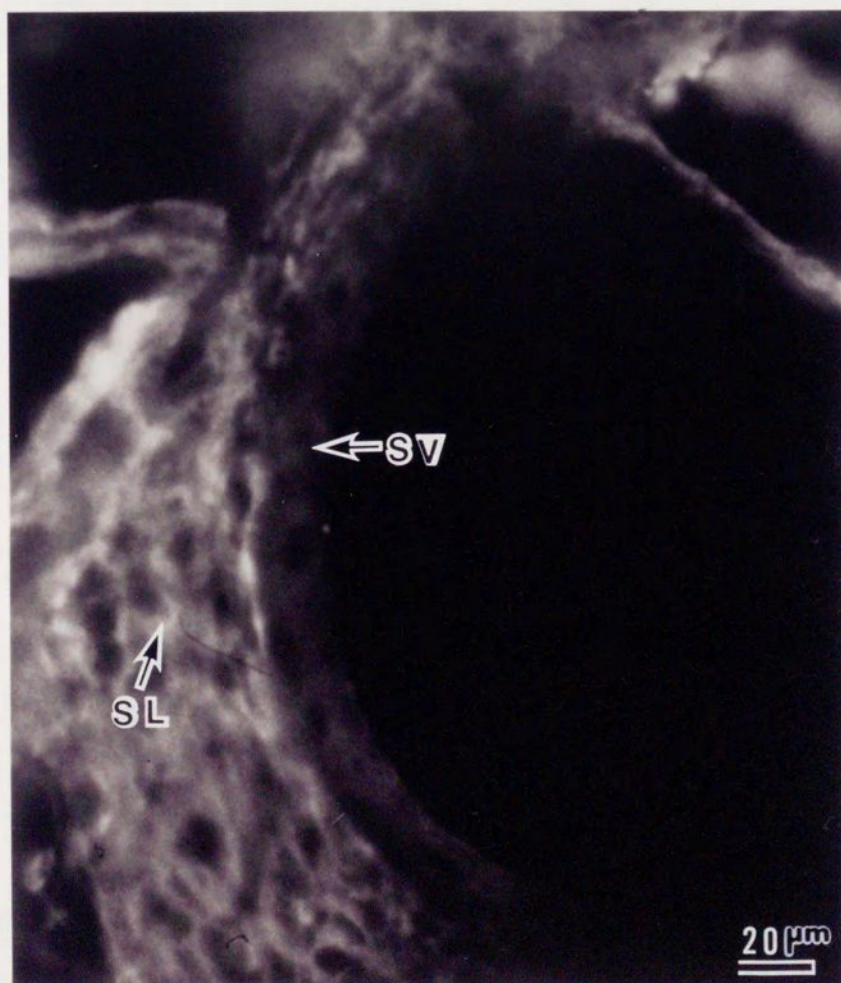
F i g . 3 8



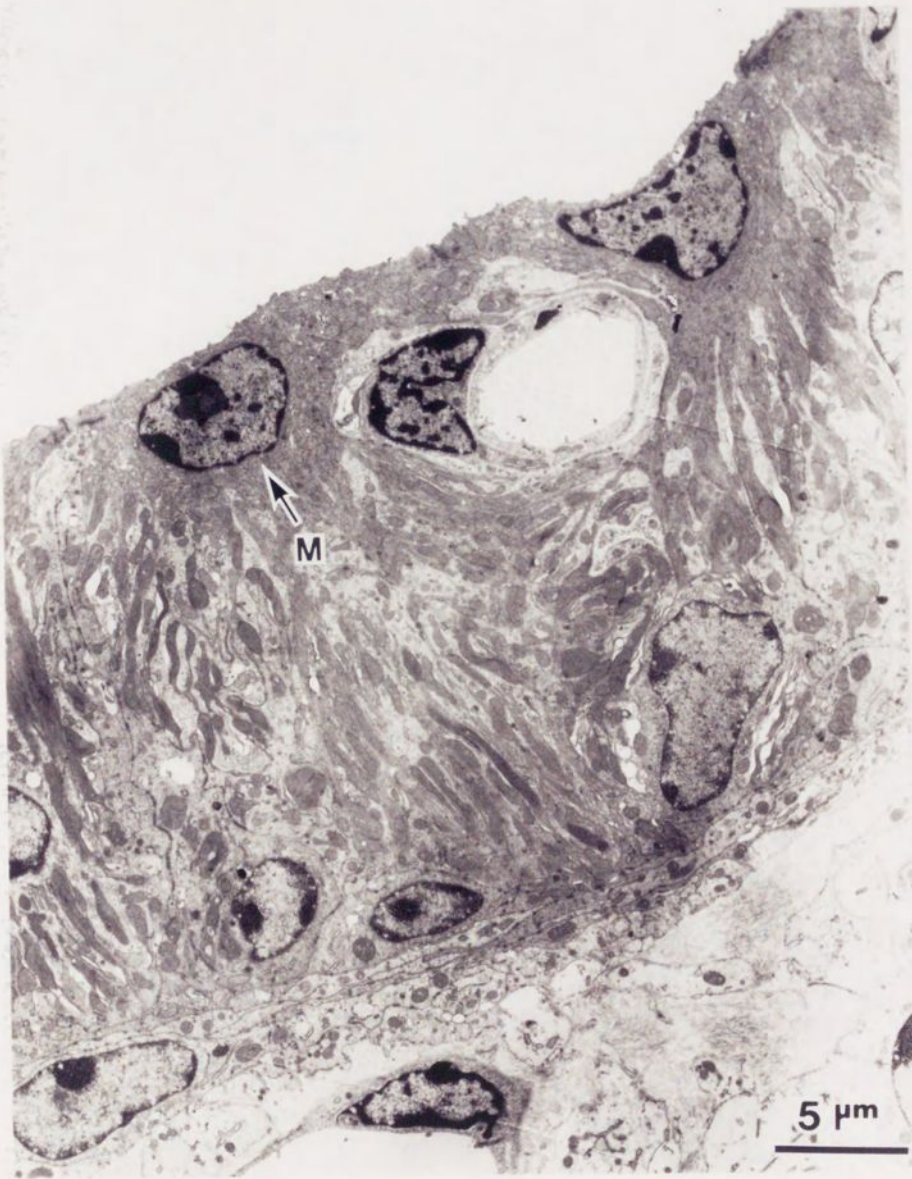
F i g . 3 9



F i g . 4 0



F i g . 4 1



F i g . 4 2



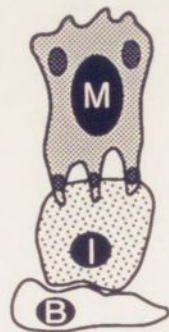
F i g . 4 3



F i g . 4 4

マウスにおける $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ の発現様式

生後 1 日



生後 7 日



生後 14 日



M : marginal cell
I : intermediate cell
B : basal cell

F i g . 4 5

表 1 胎 生 各 時 期 の モ ル モ ッ ト 数

胎 生 3 3 ~ 3 9 日	前 期	1 5 匹
胎 生 4 4 ~ 4 6 日	中 期	1 2 匹
胎 生 5 5 日 以 降	後 期	1 2 匹

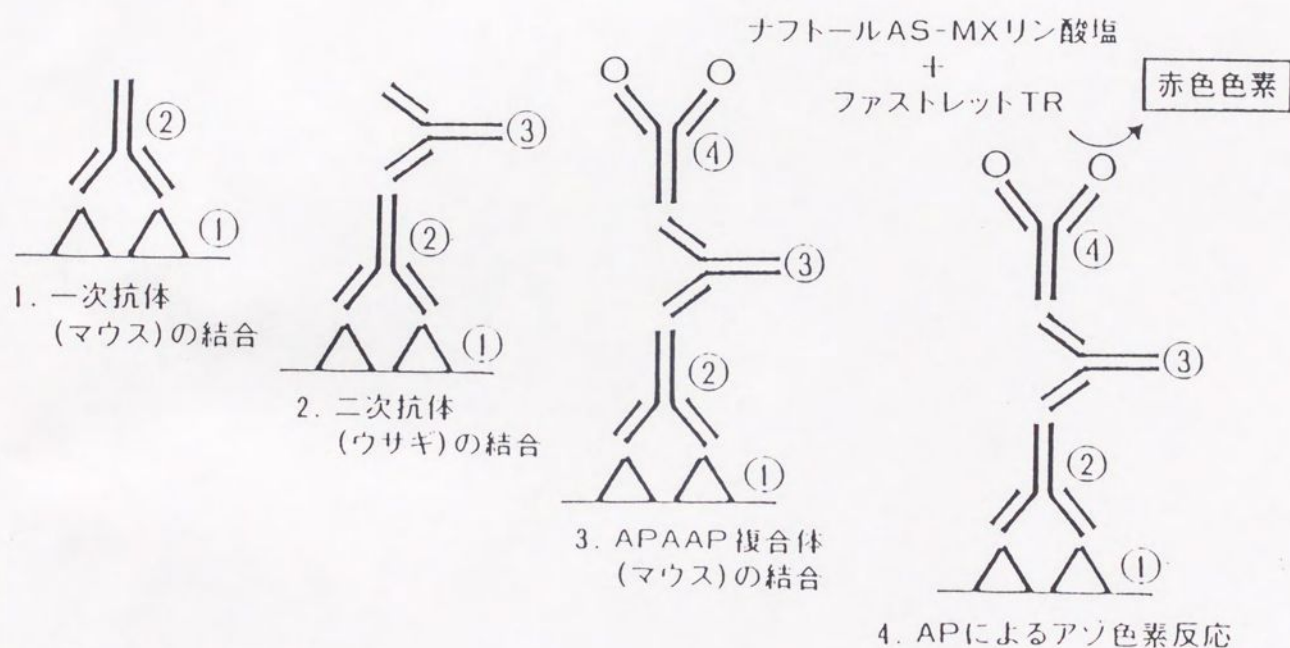
計 3 9 匹

表 2 各 時 期 の 実 験 マ ウ ス 数

胎 生 1 4 日	8 匹
胎 生 1 8 日	8 匹
生 後 1 日	1 2 匹
生 後 7 日	1 2 匹
生 後 1 4 日	1 2 匹
生 後 2 1 日	1 2 匹

計 6 4 匹

Alkalinephosphatase - Anti-Alkalinephosphatase 法 (APAAP 法)



- ① Bromodeoxyuridine (BrdU)
- ② 抗-BrdU抗体 (マウス)
- ③ 抗-マウス抗体 (ウサギ)
- ④ APAAP複合体 (マウス)